

SÉRIE A, N° 887
N° D'ORDRE : 1702

THÈSES

PRÉSENTÉES

A la Faculté des Sciences de l'Université de Paris

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

E. AUBEL

Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine de Strasbourg (Clinique Médicale B)

1^{re} THÈSE. — Recherches biochimiques sur la nutrition du bacille pyocyanique.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le **24 JANV 1922** devant la Commission d'examen

MM. M. MOLLIARD. *Président.*

P. PORTIER.
JOLEAUD } *Examineurs.*

CAEN

IMPRIMERIE E. LANIER, 31, BOULEVARD BERTRAND

1921

SÉRIE A, N° 887
N° D'ORDRE : 1702

THÈSES

PRÉSENTÉES

A la Faculté des Sciences de l'Université de Paris

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

E. AUBEL

Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine de Strasbourg (Clinique Médicale B)

-
- 1^{re} THÈSE. — Recherches biochimiques sur la nutrition du bacille pyocyanique.
- 2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.
-

Soutenues le

24 JANV 1922

devant la Commission d'examen

MM. M. MOLLIARD. *Président.*

P. PORTIER.

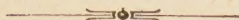
JOLEAUD } *Examineurs.*

CAEN
IMPRIMERIE E. LANIER, 31, BOULEVARD BERTRAND

1921



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS



MM.

Doyen MOLLIARD, Professeur Physiologie végétale.

Doyen honoraire . . P. APPELL.

Profes. honoraires. { P. PUISEUX.
VÉLAIN.
BOUSSINESQ.
BOUTY.

	E. PICARD	Analyse supérieure et algèbre supérieure.
	Gaston BONNIER . .	Botanique.
	KÖNIGS	Mécanique physique et expérimentale.
	GOURSAT	Calcul différentiel et calcul intégral.
	HALLER	Chimie organique.
	JOANNIS	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	JANET	Electrotechnique générale.
	WALLERANT	Minéralogie.
	ANDOYER	Astronomie.
	PAINLEVÉ	Mécanique analytique et mécanique céleste.
	HAUG	Géologie.
	H. LE CHATELIER . .	Chimie générale.
	Gabriel BERTRAND .	Chimie biologique.
	M ^{me} P. CURIE	Physique générale.
	CAULLERY	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
	C. CHABRIÉ	Chimie appliquée.
	G. URBAIN	Chimie minérale.
	Emile BOREL	Calcul des probabilités et Physique mathém.
	MARCHIS	Aviation.
	Jean PERRIN	Chimie physique.
	G. PRUVOT	Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
	ABRAHAM	Physique
	CARTAN	Mécanique rationnelle.
	Cl. GUICHARD	Géométrie supérieure.
Professeurs	LEBESQUE	Application de l'analyse à la géométrie
	LAPICQUE	Physiologie.
	GENTIL	Géographie physique.
	VESSIOT	Calcul différentiel et calcul intégral.
	COTTON	Physique théorique et Physique céleste.
	DRACH	Mathématiques générales.
	C. FABRY	Physique.
	Charles PÉREZ	Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
	DANGEARD	Botanique P. C. N.
	N.	Botanique.
	N.	Physique.
	LEDUC	Physique.
	HÉROUARD	Zoologie.
	Léon BERTRAND . . .	Géologie.
	Rémy PERRIER	Zoologie (Enseignement P. C. N.).
	LESPIEAU	Chimie.
	SAGNAC	Physique (Enseignement P. C. N.).
	RABAUD	Biologie expérimentale.
	PORTIER	Physiologie.
	BLAISE	Chimie organique.
	PÉCHARD	Chimie (Enseignement P. C. N.).

Secrétaire Daniel TOMBECK.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

Depuis le jour où Fordos isola des pansements de malades atteints de suppuration bleue, la pyocyanine ; depuis surtout, le moment où Gessard isola le bacille, producteur du pigment, nombreux sont les travaux qui eurent pour objet l'étude du microbe : mise en lumière des conditions de formation des pigments, discrimination judicieuse des caractères spécifiques, variations morphologiques, virulence, production de ferments et de corps toxiques, inoculation aux animaux et réaction de l'organisme animal contre l'infection, essais d'identification chimique de la pyocyanine. Et de tous ces travaux il ressort, entre autres, la notion d'une grande plasticité du microbe, d'une facilité remarquable d'adaptation aux milieux simples, chimiquement définis, condition particulièrement favorable à l'étude de certains problèmes. C'est, avec la propriété pigmentaire, réactif si sensible des variations introduites dans la physiologie du microbe, en même temps que caractère spécifique facile à saisir, ce qui nous a décidé à entreprendre sur le bacille pyocyanique les recherches que nous allons exposer au cours de ce travail. Ces recherches constituent une étude biochimique sur la nutrition d'un microorganisme. Il existe déjà des travaux analogues, mais les inconnues qui demeurent sont si nombreuses, la possibilité de résoudre

d'une manière plus facile ou d'entrevoir la solution de certaines questions du métabolisme, quasi insolubles chez les êtres supérieurs, est si tentante, que nous avons cru qu'il ne serait pas inutile d'essayer d'ajouter aux résultats de nos devanciers.

Nous avons abordé successivement les points suivants :

a) *Nécessité des différents constituants.* — La souche, soigneusement identifiée, nous nous sommes préoccupé d'établir un milieu minimal permettant au microbe de végéter d'une façon suffisante, en conservant le pouvoir d'élaborer la pyocyanine. Dans ce milieu, nous avons cherché la valeur des différents constituants, leur nécessité, leur remplacement.

b) *Dégradation de la source d'azote.* — Nous nous sommes ensuite attaché à suivre la dégradation de l'unique source d'azote expérimentée : l'asparagine.

c) *Dégradation des différentes sources de carbone.* — Puis, remplaçant l'amide par un mélange chlorure d'ammonium-source carbonée organique, nous avons poursuivi les stades de dédoublement des différentes sources de carbone (glucose, lévulose, glycérine, sels de soude d'acides organiques) sans qu'il puisse y avoir confusion entre les produits de dégradation de l'amino-acide et de la source de carbone organique.

d) *Influence de la nature de la source de carbone sur la vitesse d'assimilation de l'azote.* — Il nous a été alors possible d'étudier l'influence de la nature de la source de carbone sur la consommation de l'azote par le bacille.

e) *Conditions de formation de la pyocyanine.* — La disparition du pouvoir chromogène du bacille dans les cultures

contenant du glucose ou du lévulose nous a amené à chercher les raisons de cette disparition. C'est le point de départ de notre chapitre sur les conditions de formation de la pyocyanine.

f) *Pouvoir stérilisant des acides.* — Enfin, la constatation du fait que les hydrates de carbone acidifient le milieu de culture nous a conduit à essayer de déterminer l'acidité maxima permettant la culture et de voir les relations possibles entre la nature des différents acides et leur pouvoir stérilisant.

Nous ne prétendons pas avoir résolu les questions que nous avons abordées. Au contraire, et souvent nous avons dû nous contenter d'indiquer ce qui, à notre sens, restait à faire, à émettre des hypothèses que nous nous proposons, le plus tôt possible de vérifier.

Je tiens à renouveler ici, à mon maître, M. Molliard, l'expression de ma profonde reconnaissance ; grâce à son enseignement, j'ai acquis le désir de la recherche scientifique ; son accueil bienveillant et ses conseils m'ont grandement aidés à persévérer dans cette voie.

Je remercie M. le Dr Cambier, directeur du laboratoire d'hygiène de la ville de Paris, qui m'a permis de commencer, dans son service, les études publiées ici. Ces études ont été terminées à Strasbourg, dans le laboratoire de M. le Professeur Blum. Je n'ai pas besoin de dire tout ce que je lui dois, ni le profit que j'ai pu tirer d'un contact journalier avec celui dont les recherches sur la dégradation des acides gras sont devenues classiques.

Je dois également remercier Messieurs les professeurs Ambard pour son hospitalité cordiale ; Nicloux, dont j'ai mis tant de fois à contribution l'inépuisable obligeance ;

Terroine, qui m'a consacré un temps précieux et m'a libéralement donné ses avis ; mes amis Blanchetière, Vlès, Wurmser, qui m'ont aidé, au cours de conversations nombreuses, à débrouiller le sens de phénomènes obscurs pour moi.

Enfin, c'est à l'Abbé Colin et à Frouin que je dois d'avoir appris à travailler ; avec eux j'ai commencé mes premières recherches, et depuis, constamment j'ai eu recours à eux. La joie avec laquelle je leur adresse ici, le témoignage de mon amicale gratitude n'est qu'un faible tribut.

CHAPITRE PREMIER

Origine et caractérisation du microbe

a) *Origine et caractères morphologiques.* — Le bacille dont nous nous sommes servi au cours de ces recherches a été isolé d'une eau d'égout de la ville de Paris. Ses caractéristiques sont celles du microbe de Gessard : bâtonnet mobile à extrémités arrondies poussant en voile dans les cultures sur bouillon : au microscope, il apparaît en courtes chaînettes ou en petits amas ne prenant pas le Gram.

b) *Production de pigments.* — Cultivé sur gélatine, il la liquéfie et la colore en vert. Sur gélose ordinaire, il forme une couche à reflets nacrés entourée d'une zone fluorescente verte qui gagne peu à peu toute la surface du milieu et descend dans la profondeur. Plus tard, cette teinte verte fait place à une teinte brunâtre. Enfin, il m'a été facile d'isoler des cultures sur bouillon la pyocyanine et le pigment fluorescent.

c) *Action sur les substances azotées.* — En milieu nitraté il se montre dénitrifiant énergique, propriété signalée

depuis longtemps par Weissenberg et par Wolff, libérant même de l'azote aux dépens des nitrates. C'est un dénitrifiant direct suivant la classification de Grimbert. Les cultures sur lait ont montré une coagulation partielle, avec production de grandes quantités d'ammoniaque aux dépens de la caséine. Le microbe n'a pas donné d'indol.

d) *Action sur les hydrates de carbone.* — Vourloud, cultivant le pyocyanique sur agar tournesolé à 2 p. 100 et sucre à 1 p. 100, a obtenu un virage avec la glycérine, le xylose, l'arabinose, le galactose et peut-être le saccharose : le milieu est resté bleu avec le lévulose, le glucose (confirmation du travail de Lehmann et Neumann), le maltose.

Mais la technique employée par Vourloud, technique fort répandue et qui consiste à ajouter le sucre au milieu, à stériliser le tout, puis à adjoindre l'indicateur stérilisé à part, nous semble sujette à quelques critiques :

1° Avec le pyocyanique, comme avec nombre de microbes réducteurs, il faut toujours compter sur une décoloration partielle et parfois totale de l'indicateur ;

2° Certains bioses, comme le saccharose, sont en partie hydrolysés :

3° Les sucres peuvent, ainsi que l'a montré Maillard, donner avec les acides aminés des combinaisons humiques, la réaction amorcée à 120 degrés pouvant se poursuivre à 37 degrés. Et la réaction libère du gaz carbonique.

Le mieux est donc, et ce fut la technique à laquelle nous nous sommes arrêté, de stériliser à part les sucres à l'autoclave s'il s'agit d'hexoses, de maltose ou de lactose (ces deux bioses, s'hydrolysant difficilement en milieu

aqueux à la température de la stérilisation) à la bougie s'il s'agit de saccharose, et de faire le mélange avec le milieu nutritif au moment de l'ensemencement. En outre, l'acidification doit être suivie par titrimétrie ce qui est préférable à l'observation du virage dans un milieu tournesolé. Le pyocyanique est un gros producteur d'ammoniaque et une partie des acides formés aux dépens des sucres est neutralisée par l'alcali, si bien qu'une diminution de l'alcalinité initiale peut être décelée par un dosage alors que le milieu coloré n'a pas viré. Nous avons même cru bon, dans les cas douteux, de titrer l'acidité volatile suivant la méthode de Duclaux, dans deux séries de matras, une avec sucre, l'autre sans sucre.

Cette technique nous a conduit aux résultats suivants, ne concordant pas entièrement avec ceux de Vourloud : aucune attaque des bioses, saccharose, lactose, maltose, ni de la mannite. Le glucose, le lévulose et la glycérine sont attaqués.

e) *Distinction d'avec la bacille fluorescent de Flügge.* — Nous nous sommes attaché à essayer de déterminer la limite entre le pyocyanique et le fluorescent liquéficient. Ces deux microbes sont voisins et l'on peut même lire dans l'article de Heller et Lepère du Kolle-Wassermann que le pyocyanique achromogène est impossible à distinguer du fluorescent liquéficient. Ruzicka prétend que les produits formés aux dépens des matériaux nutritifs n'ont rien de caractéristique, les caractères cultureux ou morphologiques sont identiques dans les deux espèces, il en est de même de l'attaque des sucres, du pouvoir protéolytique et du pouvoir réducteur. L'agglutination même ne donne pas une certitude absolue et la virulence

est très variable. Le seul caractère distinctif consisterait donc dans la production de pyocyanine. Or, si ce caractère a une valeur réelle, il peut malheureusement manquer, soit parce que le milieu ne permet pas au microbe de produire le pigment (albumine d'œuf, Gessard, 1), soit parce que la présence d'antiseptiques (Wasserzung) ou un chauffage à une température supérieure à 57 degrés (Gessard, 2) crée une race incapable de sécréter la matière colorante, soit parce qu'il existe une association avec d'autres microorganismes : Oïdium (Schimmelbusch et Musham) streptocoques (Krause). On est donc bien tenté de souscrire à l'opinion de Heller et Lepère citée plus haut.

Pourtant, il existe une méthode fort simple pour distinguer les deux espèces. Il suffit de les cultiver comparativement sur milieu sucré (glucose) et sur milieu sans sucre et de suivre la marche de la production d'ammoniaque. On constate pour le fluorescent une action inhibitrice nette des hydrates de carbone assimilables sur l'attaque des substances azotées (Blanchetière), pour le pyocyanique, au contraire, l'adjonction de sucre fermentescible exalte la formation de produits ammoniacaux (Boehme, Kendall et Farmer). Il faut noter que dans les cultures âgées on aboutit également à un déficit alcalin (E. Aubel et H. Colin), mais ce déficit alcalin est dû, non à un arrêt de l'attaque de la source azotée, comme pour le fluorescent, mais à une consommation exagérée d'ammoniaque, ainsi que nous le montrerons plus loin.

CHAPITRE II

Culture du pyocyanique au milieu chimiquement défini. Milieu minimal permettant au bacille de pousser

Depuis les essais de Pasteur, depuis le travail classique de Raulin, nombreux sont les travaux qui ont eu pour but l'obtention de milieux artificiels de composition chimique connue et propres au développement des organismes inférieurs. — Mais, soit désir d'obtenir un poids de récolte maxima, soient exigences particulières de la bactérie ou de la levure étudiée, de tels milieux sont habituellement complexes. Or, pour les recherches que nous avons tentées il nous a semblé logique de partir d'un milieu type, simple, ayant l'avantage de permettre de saisir facilement le mode d'attaque des matières fermentescibles qu'on pouvait y incorporer, et les produits du métabolisme microbien. Ce milieu déjà employé par

Frouin et M^{lle} Ledebt est une simplification du milieu d'Arnaud et Charrin ; il a la composition suivante :

Asparagine	5 gr.
Sulf. de Mg.	1 —
Phosph. de potasse (mon.). .	2 —
Eau q. s. pour	1.000 —

Le bacille pyocyanique y donne des cultures suffisantes. Tous les corps qui y rentrent sont-ils absolument nécessaires ; peut-on les supprimer ou les remplacer par d'autres ? Telle est la première question que nous nous sommes posée.

Aliment organique. — Asparagine

L'asparagine constitue dans le milieu à la fois la source d'azote et la source de carbone.

Source d'azote. — Asparagine

a) *Nécessité.* — Konwaleski a signalé que le pyocyanique était capable d'assimiler une petite quantité d'azote libre.

Pour notre part, jamais, même en ajoutant au sulfate de Mg et au phosphate de K de la glycérine ou du glucose nous n'avons pu obtenir autre chose qu'un louche très léger, et dans ce cas un repiquage était impossible. Le faible développement était donc imputable aux traces d'azote organique que la semence apportait avec elle.

b) *Remplacement de l'asparagine.* — Galimard et Lacomme ont obtenu des cultures avec le glycocolle et la leucine.

Mais leur milieu complexe contenait de la glycérine, et la stérilisation avait lieu en une fois sur le milieu total. Or, nous avons constaté, et nous reviendrons là-dessus, qu'un acide aminé inattaquable, comme le glyocolle, était attaqué si on lui adjoignait un aliment ternaire assimilable et que, d'une façon générale, il peut arriver qu'un corps azoté, non attaqué par le bacille, le soit s'il se trouve mélangé à un corps attaquant (Glyocolle et asparagine par exemple, confirmation de ce qu'a vu Blanchetière sur le fluorescent, ou glyocolle et glycérine) ou même de corps non attaquables s'ils se trouvent associés (Sarcosine et glucosamine attaqués par le bacille tuberculeux lorsqu'ils sont associés et inattaquables s'ils sont séparés, ainsi que l'a vu Frouin). Il fallait donc reprendre la question. Nous n'avions pas à nous préoccuper de substances azotées complexes comme la peptone ou le bouillon. Il eut été intéressant d'étudier les purines, les corps pyrimidiques et les acides diaminés. Les difficultés que nous avons rencontrées pour nous procurer un nombre suffisant de ces produits ne nous l'ont pas permis. Nous nous sommes borné à tenter la substitution à l'asparagine des acides monoaminés, des amines, des amides ou des sels ammoniacaux à radicaux organiques ou minéraux.

1° avec le glyocolle et la leucine nous n'avons pas eu de cultures.

La cystine et la tyrosine ont permis un développement faible avec possibilité de repiquage.

L'alanine, l'acide glutamique, les acides aspartiques ont permis un développement normal.

Tous ces acides aminés étaient des produits naturels et employés seuls, sans adjonction de sucre.

2° Aucune des amines étudiées ; mono, di, et triméthylamine, mono-éthylamine, propylamine n'a permis de développement, même en présence d'hydrate de carbone. C'est là un résultat à première vue surprenant si l'on songe que le microbe assimile l'azote à l'état de sel ammoniacal. Pourtant Armand Delille, Mayer, Schaeffer et Terroine ont déjà constaté que le bacille tuberculeux qui utilise le glycocolle n'utilise pas l'éthylamine. Quelle est la cause de cette non utilisation, toxicité ou empêchement stérique, le carboxyle permettant l'hydrolyse, un groupement CH ne la permettant pas ?

3° L'acétamide, la propionamide, l'urée n'ont pas permis de développement. Avec l'urée, nous avons obtenu un voile léger avec possibilité de repiquage lorsque nous avons ajouté au milieu une source hydrocarbonée.

4° Le succinate d'ammoniaque seule source organique permet un bon développement, ainsi que l'a déjà signalé Gessard. Il en est de même du citrate d'ammoniaque. Si l'on adjoint au sel ammoniacal un sucre, tous les acides organiques étudiés permettent le développement plus ou moins bon (formiate, acétate, butyrate, tartrate, malate, lactate, azotate d'ammoniaque). Il en a été de même des chlorure, sulfate et azotate d'ammoniaque. Certains des acides étudiés ont été signalés par Macé, comme pouvant servir de source d'azote.

Nous pouvons résumer nos résultats dans le tableau suivant :

Substances azotées fournies au bacille

ACIDES AMINÉS	AMINES	AMIDES	SELS AMMONIACAUX
Glycocolle.	0	a) <i>Sans source de carbone</i>	a) <i>Sans source de carbone</i>
Alanine	++		Succinate d'NH ³ ++
Cystine.	+	Acétamide 0	Citrate ++
Leucine	0	Propionamide 0	
Asparagine	++	Urée 0	b) <i>Avec source de carbone</i>
Acide aspartique inactif.	++	b) <i>Avec source de carbone</i>	Formiate d'NH ³ +
Acide glutamique	++		Acetate ++
Tyrosine.	+	Urée +	Butyrate +
(Si l'on ajoute une source de carbone, le glycocolle permet la culture).			Tartrate ++
			Malate ++
			Lactate ++
			Oxalate ++
			Chlorure +
			Sulfate +
			Azotate +

La source de carbone. — Asparagine

a) *Nécessité.* — Sans carbone organique, même si l'on ajoute de l'azote ammoniacal aux sels, le bacille ne pousse pas.

b) *Remplacement.* — Ultérieurement nous aurons l'occasion de montrer que l'asparagine est loin d'être l'aliment carboné de choix. Bien préférables sont les hydrates de carbone assimilables : glucose, lévulose ou la glycérine. L'acide succinique, l'acide citrique ou plutôt les succinates et les citrates peuvent également remplacer sans dommage l'asparagine. Un milieu où la source azotée est constituée par du sulfate ou du chlorure d'ammoniaque et la source carbonée par un formiate, un acétate, un lactate, un tartrate, un butyrate ou un oxalate de sodium ne permet pas le développement, ou un développement très faible sans qu'il soit possible d'obtenir un nouveau passage sur le même milieu. Un acide dont le sel ammoniacal est attaqué peut donc demeurer intact s'il est à l'état de sel de soude, de potassium ou de calcium. C'est le cas des formiates, acétates, lactates, butyrates. Na, K ou Ca bloque donc l'attaque, alors que cette attaque est permise par NH_3 à la suite d'une désamination.

Il est évident qu'on ne pouvait songer à employer comme source hydrocarbonée les bioses qui ne sont pas attaqués, de même que l'amidon et la mannite.

Aliments minéraux { Sulfate de magnésie
Phosphate monopotassique

Ici, nous nous heurtons à une difficulté technique sérieuse. Celle d'opérer avec des corps exempts d'impuretés. Les travaux de Gabriel Bertrand et de ses élèves

ont montré l'importance autrefois insoupçonnée de traces de certains corps. Nous sommes partis de sels purs recristallisés quatre fois dans l'eau redistillée. Les cristalliseurs, l'appareil à distiller, les ballons de culture, étaient en quartz. Nous pensons ainsi avoir réduit au minimum les causes d'erreur.

La source de soufre. — Sulfate

a) *Nécessité.* — Benecke, Frouin et M^{lle} Ledebt ont déjà montré que sans soufre le bacille ne poussait pas. Nous l'avons vérifié nous mêmes plusieurs fois avec un milieu où le sulfate de magnésie était remplacé par du phosphate de magnésie.

b) *Remplacement.* — Il est possible de remplacer le soufre minéral par le soufre organique, de l'albumine d'œuf débarrassée de ses sels par dialyse. Il reste à chercher s'il est possible d'utiliser comme source de soufre du soufre minéral autre que le sulfate, ou le soufre organique de la cystine. Pour ce dernier corps, cela est fort probable, puisque le soufre de l'albumine d'œuf est à l'état de di thio-alanine. D'autre part, le soufre n'est pas remplaçable par la sélénium à l'état de séléniate .

EXPÉRIENCE III. — Milieu de départ : Eau 1.000, Asparagine 5 gr., KCl 1 gr., Phosphate monopotassique 1 gr., MgCl² 1 gr.

Culture au bout de 8 jours

Témoin sans soufre	+	(repiquage négatif)
Témoin avec SO ⁴ K ² 1 p. 1.000. .	+++	
I. Séléniate de Na 1 p. 1.000. .	0	
II. — 1 p. 5.000. .	0	

III.	—	1 p. 10.000 .	+	(repiquage négatif)
IV.	—	1 p. 20.000 .	+	—
V.	—	1 p. 40.000 .	+	—
VI.	—	1 p. 100.000	+	—

La source de phosphore. — Phosphate

a) *Nécessité*. — Comme pour le soufre, la nécessité absolue du phosphore a déjà été démontrée par Benecke et Frouin et M^{lle} Ledebt. Nous avons obtenu confirmation de leurs résultats avec des milieux où le phosphate de potasse était remplacé par du sulfate de potasse.

b) *Remplacement*. — Le phosphore minéral est remplaçable par le phosphore organique du nucléinate de soude.

EXPÉRIENCE I. — Le milieu de départ est : Eau 1.000, Asparagine 5 gr., SO⁴Mg 1 gr., SO⁴K².

Culture au bout de 8 jours

Témoin sans phosphore	+	(repiquage négatif)
Témoin phosphate monopotassique		
1 p. 1.000	+++	
I. Nucléinate de Na (de la levure) 2 p. 1.000	+++	
II. — — — — — 2 p. 1.000	+++	
III. — — — — — 1 p. 1.000	+++	

Il est bien probable que les lécitines sont également utilisés par le microbe qui cultive sur le jaune d'œuf.

Bien des expériences restent encore à faire : étude des sources de phosphore minéral autres que les phosphates, étude des sources de phosphore organique possibles : glycéro-phosphate, lipoides phosphorés, etc. Comme le

soufre, le phosphore est irremplaçable par d'autres éléments minéraux. Les arséniate ne permettent aucun développement et sont toxiques.

EXPÉRIENCE I. — Milieu de départ : Eau 1.000, Asparagine 3 gr., SO^4Mg 1 gr., SO^4K^2 1 gr.

Culture au bout de 8 jours

Témoin sans phosphore.	+	(repiquage négatif)
I. Arseniate de Na 1 p. 500	0	
II. — — — 1 p. 1.000	0	
III. — — — 1 p. 10.000	0	

La source de magnésie. — Magnésie

a) *Nécessité.* — La nécessité du Magnésium a été fort discutée. Thumm, Noske, Gessard, Frouin et M^{lle} Ledebt admettent que le pyocyanique se développe dans un milieu exempt de magnésie. D'une façon générale, on pense que le magnésium ne servirait que pour l'obtention de pyocyanine. Benecke est d'un avis opposé, pour lui avec des traces de magnésie on peut faire pousser le bacille, sans magnésie aucune croissance n'est possible. Il est évident qu'il s'agit en l'espèce d'une question de pureté des produits. Le verre ou plutôt certains verres laissent à 120°, surtout si la réaction du milieu n'est pas neutre, passer des traces de magnésie. En opérant dans du quartz avec des produits purs nous avons observé au début un développement indéniable, et ce n'est qu'au quatrième ou cinquième passage que tout développement

s'est arrêté. Le magnésium est donc indispensable, mais il en suffit de faibles quantités pour que l'on obtienne un développement. Un milieu renfermant $\frac{1}{10\ 000}$ de sulfate de magnésie convient tout à fait au microbe. On peut même descendre beaucoup plus bas $\frac{1}{50\ 000}$ et les traces de sel apportées avec la semence suffisent à assurer un développement convenable surtout si l'on a soin d'ensemencer en surface.

b) *Remplacement.* — Le calcium et le strontium ne peuvent remplacer le magnésium. Le vanadium qui, ainsi que l'a montré Frouin, augmente notablement le poids des récoltes ne s'est pas montré à la dose de $\frac{1}{6\ 000}$ capable d'assurer le développement du microbe.

La source de potassium. — Potasse

a) *Nécessité.* — Pour Benecke, Gessard, Frouin et M^{lle} Ledebt, le potassium est un élément indispensable à la vie du microbe. Pour Thumm également ; mais comme ce dernier supprimait dans son milieu de culture à la fois le potassium et le phosphore, l'expérience n'était pas concluante. Jordan prétend, d'autre part, qu'un fluorescent isolé d'une eau d'égout n'a besoin, pour vivre, que de calcium, azote, soufre, phosphore et d'une base dont la nature est indifférente : potassium, calcium, magnésium, ammonium, présentent, au point de vue cultural, une valeur égale. Sullivan confirme les travaux de Jordan. Le développement constaté était faible. Benecke a lui-même confirmé ce fait ; s'il conclut à la nécessité du potassium, ce n'est point parce qu'il n'a eu aucun développement, mais bien parce qu'il pense que le développement léger

était dû à des impuretés : Da dieses Wachstum in « kalifrein » Lösungen vollkommen regellos, ohne jegliche erkennbare Gesetzmässigkeit auftritt, kann es nur auf zufällige Verunreinigung einzelner Kolben mit Kaliumspuren aus dem Staub der Luft u. s. w. beruhen.

Nous avons repris la question et avons constaté la nécessité absolue du potassium. Dès le troisième passage en milieu chimiquement exempt de potassium, il n'y a plus de développement. La dose limite assignée par Benecke pour permettre au bacille de pousser est de $\frac{1}{10\ 000}$ de milligramme pour 100 cc. Nous avons constaté une culture avec 0,002 % de sulfate de potasse. Au-dessous, le liquide est resté stérile.

b) *Remplacement.* — Jordan, Sullivan et Noske pensent avoir démontré que le potassium peut être remplacé par le lithium, l'ammonium et le sodium. Loew conteste cela, mais affirme que le rubidium a un pouvoir certain de remplacement. Benecke confirme Loew et ajoute que le coesium peut également remplacer le potassium. Nous avons à notre tour constaté que le potassium peut être remplacé par le rubidium et le coesium, mais que la quantité minimale de ces corps permettant la culture était sensiblement deux fois plus élevée pour le rubidium que pour le potassium et trois fois plus pour le coesium.

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSION

Ainsi azote, carbone, oxygène, hydrogène, phosphore, soufre, potassium, magnésium, tels sont les corps simples nécessaires pour obtenir le développement du pyocyanique, le carbone seul devant être à l'état de combinaison orga-

nique. Certes, avec un tel milieu on est loin d'obtenir comme Raulin avec l'*aspergillus niger* le poids de récolte maximal ; mais nous ne nous étions pas proposé un tel but. Nous voulions établir un milieu minimal renfermant des aliments fondamentaux nécessaires au microbe, les éléments plastiques. Il n'y avait aucun doute quant à l'azote, l'hydrogène, l'oxygène et le carbone. On savait également qu'il fallait des éléments minéraux. Il y a longtemps que Pasteur avait constaté qu'une faible quantité de cendres est nécessaire au développement des mucédinées : mais quels éléments sont indispensables dans ces cendres ? Raulin, qui a supprimé tour à tour phosphore, potassium, magnésium et soufre, n'obtient plus à la place d'une abondante récolte qu'une chétive végétation, encore y-a-t-il végétation, et cette remarque pourrait s'appliquer à la plupart de ceux qui ont étudié les cultures en milieu synthétique. D'autre part, il y avait même pour le bacille pyocyannique souvent divergence de résultats quant à la nécessité du potassium et du magnésium. Nous nous garderons, d'ailleurs, de généraliser trop hâtivement. Il est certain que ce que nous avons constaté pour le pyocyannique ne peut s'appliquer entièrement, ni à l'*aspergillus niger*, ni au bacille tuberculeux, par exemple. Pourtant, n'y a-t-il pas des faits d'une portée assez étendue ?

a) *Aliments plastiques irremplaçables et aliments plastiques remplaçables.* — D'abord si la division en éléments plastiques et en éléments catalytiques de Bertrand doit être maintenue, il nous semble qu'il faille subdiviser les aliments plastiques en 2 catégories : les aliments plastiques irremplaçables du type azote et les aliments plastiques

remplaçables du type potassium. Cette division semble devoir être vraie pour d'autres êtres ; Sauton a constaté le remplacement du K par le Rb chez l'aspergillus et le bacille tuberculeux, et Javillier (4), cite le fait que Grandeau a trouvé le Rb et le Cs à côté du K dans la betterave. Cette faculté de remplacement de certains corps s'étend peut-être plus loin. Zwardemaker a pu remplacer dans les liquides physiologiques permettant la survie du cœur, le potassium par le rubidium ou le coesium, puis simplement par des rayons β .

b) *Aliments plastiques remplaçables et aliments catalytiques.* — On peut se demander si dans le cas du K il n'y a pas quelque chose d'analogue à ce qui se passe pour les éléments catalytiques comme le Zn, dont l'action spécifique a été bien établie par Javillier (1, 2, 3) dans certaines conditions et auquel, d'après Lepierre, on peut substituer le glucinium, le cadmium, le cuivre, l'uranium, si l'on ne cherche pas à avoir le même effet dans des temps égaux. Une différence fondamentale avec les éléments catalytiques existe : un élément plastique remplaçable ne peut pas être supprimé purement et simplement, alors qu'il suffit de modifier la hauteur du liquide de culture par rapport à son volume pour avoir une culture normale d'aspergillus sans Zn (Lepierre) ; quelles que soient les conditions de température d'accès d'oxygène, de densité, la suppression du K entraîne la stérilité du milieu.

c) *Aliments énergétiques.* — Ce que nous avons vu aussi, c'est que la valeur nutritive d'une substance pouvait être modifiée par la présence d'une autre substance. Déjà Proskauer et Beck avaient montré la nécessité de la

glycérine¹ pour l'assimilation des amino-acides par le bacille tuberculeux, et si Armand Delille, Mayer, Schaeffer et Terroine ont diminué notablement la proportion de cet alcool dans leur milieu synthétique il n'ont pas pu le supprimer. C'est que la source carbonée organique est à la fois source plastique et source énergétique pour la bactérie, et l'on comprend que le pyocyanique puisse, si on lui donne les composés carbonés qui lui sont nécessaires, se servir du glycocolle comme source d'azote au même titre que les sels ammoniacaux des acides.

d) *Propriétés synthétisantes.* — Le pyocyanique semble posséder des propriétés synthétisantes remarquables. Alors que l'on a besoin de fournir au bacille tuberculeux un mélange d'acides mono-aminés et de substances extractives (Armand Delille, Mayer, Schaeffer et Terroine), c'est-à-dire renfermant un noyau guanidine (Mayer et Schaeffer) pour obtenir une culture, le pyocyanique est capable de constituer, en se servant de simples sels ammoniacaux et de carbone organique, l'ensemble complexe des amino-acides nécessaires, c'est-à-dire de former des noyaux sulfurés, aromatiques et hétérocycliques. Il y a là tout un processus dont le point de départ est sans doute l'alanine formée à partir de l'acide pyruvique provenant de la dégradation des hydrates de carbone comme nous le verrons plus loin, et de l'ammoniaque de la source azotée :



¹. Frouin a montré récemment que la glycérine n'était pas nécessaire pour obtenir une culture de bacille tuberculeux. Mais il faut employer alors une autre source carbonée (sucre) pour que l'assimilation de l'azote de l'asparagine puisse se faire.

cette construction de l'acide aminé aux dépens de l'acide cétonique étant analogue à celle observée par Knoop chez le chien, Embden et Schmitz sur le foie perfusé.

La production d'acide pyruvique par désamination est d'ailleurs également probable, et c'est sans doute parce qu'ils sont incapables d'en donner que certains amino-acides ne sont utilisés qu'en présence d'une source de carbone assimilable.

Il y a donc chez le pyocyanique un rapport étroit entre le métabolisme des hydrates de carbone et celui des matières protéiques : par l'intermédiaire de l'acide pyruvique il est possible de passer de l'alanine au sucre et des sucres à l'alanine. C'est là un mécanisme de réactions réversibles semblable à celui qu'on a trouvé chez les animaux. Nous aurons l'occasion de revenir sur ces faits, mais nous tenions dès maintenant à signaler cette analogie physiologique entre deux êtres aussi éloignés qu'un microbe et un vertébré supérieur.

CHAPITRE III

L'attaque de l'Asparagine

L'attaque d'une substance chimiquement définie, comporte deux parties ; l'étude des produits de dégradation de la substance, et l'étude du mécanisme de la dégradation.

Produits de dégradation de l'Asparagine

En ce qui concerne l'asparagine, il y a longtemps que les chimistes se sont attachés à déterminer la nature des acides produits par la putréfaction de ce corps. Piria, le premier, montra la présence d'acide succinique dans les solutions d'asparagine abandonnées à l'air libre, et en 1879, Miquel, reprenant la question, constatait que l'agent actif de cette transformation était une bactérie qu'il isolait et qu'il nommait bactérie commune. C'est un ferment aérobic poussant en voile et possédant des propriétés voisines de celles du mycoderma-acéti. Peut-être est-ce la bactérie du Sorbose ? Quoi qu'il en soit, cette bactérie commune donne aux dépens de l'asparagine du gaz carbonique, de l'ammoniaque et du succinate d'ammoniaque. E. et H. Salkowski, la même année, avaient obtenu un résultat analogue en faisant agir sur l'acide aspartique les bactéries de la putréfaction.

Ultérieurement, l'acide succinique a été isolé par de nombreux auteurs : Borchardt, Neuberg et Cappezuoli, Brasch, Abderhalden et Fodor, Blanchetière, qui, en outre, déterminèrent la nature des autres produits d'attaque. En 1907, Ellinger constata la présence d'acides gras monobasiques solubles et Borchardt, en 1909, obtint l'acide propionique : ce fait fut confirmé par Neuberg et Cappezuoli, qui signalèrent en outre la présence d'acide formique. Sauf Miquel, les auteurs s'étaient adressés pour obtenir l'attaque à un mélange de bactéries, Brasch, en 1909, cultiva la *bacillus putrificus* sur un milieu synthétique à base d'acide aspartique et montra la formation d'acides propionique formique et succinique, ce qu'avaient en somme publié Neuberg et Cappezuoli ce que Abderhalden et Fodor, en 1914, décrivirent de nouveau. Mais l'attaque de l'asparagine peut conduire à d'autres produits : avec le bacille de Flügge, Blanchetière signale à côté de l'acide succinique, de l'acide fumarique déjà obtenu par Emmerling et Reiser, de l'acide malique et de l'acide acétique. Dans ces conditions, étant donnée l'étroite parenté du bacille fluorescent et du pyocyanique, il était indiqué d'étudier l'action de ce dernier bacille sur l'asparagine.

Technique. — Le milieu avait la composition suivante .

Asparagine	5 gr.
Sulfate de Mg	1 —
Phosphate monopotassique	1 —
Eau q. s. pour	1.000 —

et les cultures étaient faites à 37°.

Au bout d'un temps variant de 15 jours à 5 semaines on procédait à l'analyse de la façon suivante.

Le liquide filtré rapidement est divisé en 2 portions A et B.

Traitement de la portion A. — (Acides fixes)

La détermination des acides fixes est faite suivant la technique exposée par Blanchetière dans son travail sur le bacille fluorescent.

Le milieu de culture alcalin, évaporé au bain-marie jusqu'aux neuf dixième de son volume est filtré, traité par HCl en excès et distillé sous pression réduite.

Au résidu on ajoute un excès de sable. Le tout est repris par l'eau distillée en faible quantité et évaporé une seconde fois dans le vide. La poudre restante est extraite au soxhlet par l'éther anhydre.

L'éther évaporé laisse un résidu constitué en majeure partie par les acides fixes et des corps gras.

Ce résidu repris par un grand volume d'eau est filtré, le filtrat évaporé sous pression réduite est additionné du minimum d'eau distillée nécessaire pour en dissoudre la presque totalité. La portion insoluble (acide fumarique) est séparée par filtration, et la partie liquide neutralisée par le baryte est additionnée d'alcool absolu jusqu'à ce que ce mélange soit à 75 % d'alcool. Dans ces conditions les sels de baryum des acides qui nous intéressent (malique, succinique, fumarique, malonique, oxalique et lactique) précipitent (Mestrezat).

Le précipité, lavé à l'alcool dilué est dissout dans l'acide chlorhydrique à 15 % et la solution est extraite par l'éther

dans un appareil à extraction continue. L'éther évaporé abandonne un résidu composé par les acides fixes.

Traitement de la portion B. — (Produits volatils)

La liqueur saturée par un lait de chaux est distillée au tiers environ. Le distillat recueilli contient les substances volatiles autres que les acides.

Le résidu refroidi est additionné d'une quantité d'acide oxalique suffisante pour précipiter la chaux. Après un repos de 24 heures on décante et on filtre, afin de séparer l'oxalate de chaux. Sur le filtrat on détermine qualitativement les acides volatils par la méthode de Duclaux, que nous avons préférée à la méthode de Dyer.

Nous pensons qu'il est bon en outre d'isoler à l'état de sels d'argent les acides formés. Pour cela la plus grande partie du liquide acidifié par l'acide oxalique est distillée sous pression réduite et le distillat examiné au point de vue acide formique. Si cet acide est décelé, on prélève une portion du liquide sur laquelle on effectue les réactions complémentaires. Au reste on ajoute, afin de détruire l'acide formique un peu d'oxyde de mercure et l'on fait bouillir une demi-heure au réfrigérant à reflux. On filtre, le filtrat est traité par H^2S , et, le précipité séparé, et l'excès d' H^2S chassé par un courant d'air, additionné d'eau de baryte. L'excès de baryte est précipité par un courant de CO^2 . Le carbonate de baryte étant séparé par filtration on réduit le liquide à quelques centimètres cubes. Souvent il se forme un voile de carbonate de baryte qu'on sépare de nouveau, et dans la solution chaude on ajoute goutte à goutte une solution concentrée

de nitrate d'argent. Il se forme un précipité, soit immédiat, soit en refroidissant. On abandonne quelques heures à la glacière et l'on filtre. Le précipité, lavé à l'eau froide est constitué par de l'acétate, du propionate ou du butyrate d'argent. La nature de l'acide est déterminée d'après la teneur en argent du sel. Cette teneur est donnée par la pesée du résidu d'argent après calcination.

Lorsqu'on a affaire à un mélange de plusieurs acides volatils, le mieux est de les séparer, au moins partiellement, par cristallisation fractionnée des sels de baryte. Nous avons plusieurs fois essayé d'appliquer la méthode, excellente d'ailleurs, lorsque la concentration est suffisante, d'Agulhon. Malheureusement les quantités d'acides examinées ont toujours été trop faibles pour que nous obtenions un résultat positif. Il nous aurait fallu prélever une quantité telle du liquide concentré que l'analyse ultérieure des sels d'argent eût été impossible.

RÉSULTATS

a) *Acides fixes*. — La recherche de l'acide tartrique (par la réaction de Moehler, modifiée par Denigès, et la formation du précipité de tartrate acide de K), de l'acide oxalique (par la formation d'oxalate de chaux), de l'acide malonique (par la méthode de Bougault), de l'acide lactique (par la méthode de Hopkins), est restée constamment négative. Il en a été de même pour l'acide succinique bien que nous nous soyons attaché particulièrement à le déceler. Jamais les cristaux provenant de l'évaporation de la solution éthérée ne nous ont donné la réaction du pyrrol, jamais leur solution aqueuse neutralisée n'a donné,

avec le perchlorure de fer, le précipité caractéristique de succinate de fer.

Par contre, nous avons pu mettre en évidence l'acide fumarique et l'acide malique.

ACIDE FUMARIQUE. — Il constitue le résidu presque insoluble dans l'eau distillée lorsque l'on reprend par ce solvant l'extrait soluble dans l'éther séparé des graisses. Nous avons pu caractériser cet acide ; d'une part, grâce à sa transformation sous l'action de l'eau de brome à 100° en acide dibromo-succinique lequel donne, avec la résorcine, la teinte rouge violacée caractéristique de l'acide tartrique en qualité d'éther de cet acide (Denigès) ; d'autre part, grâce à sa transformation en anhydride maléique, puis en maléine anilide, suivant la technique de Michael, modifiée par Blanchetière. Les cristaux de maléine anilide obtenus aux dépens de l'acide fumarique fondaient à 210° (théorie : 212, 213°).

ACIDE MALIQUE. — A la solution aqueuse des acides fixes traitée par 1/10 de son volume d'acétate mercurique et portée ensuite à l'ébullition, nous avons ajouté goutte à goutte du permanganate de potasse. Rapidement il s'est formé un précipité blanc caractéristique d'oxalacétate de mercure formé aux dépens de l'acide malique (Denigès).

Le résidu de l'évaporation de 1 cc de la solution des acides fixes chauffée dans une capsule de porcelaine avec 10 gouttes de réactif de Pinérua a donné une coloration vert-jaune, passant au jaune vif et virant à l'orangé par addition d'eau.

b) *Acides volatils.* — La quantité d'acides volatils produite par 5 gr. d'asparagine est très faible. Les dosages

ont dû être effectués avec de l'eau de chaux (dont 22 cc ont saturé 10 cc d'acide chlorhydrique $\frac{N}{10}$) que l'on a diluée au 1/10. La quantité d'eau de chaux diluée employée a été de 6 cc 4 pour saturer 100 cc de distillat représentant la totalité des acides contenus dans 110 cc de culture (pour faciliter les calculs, nous avons ramené le filtrat débarrassé d'oxalate de chaux à 1 litre). Ce qui représente en milligrammes par litre $\frac{6,4 \times 1000 \times 4,6}{110 \times 10 \times 2,20} = 12,16$ d'acide formique.

En réalité, il s'agit non d'acide formique, mais d'un mélange de 10 parties d'acide formique pour une partie d'acide propionique.

	Pourcentage de l'acide à la distillation	Pourcentage calculé pour 10 ac. form. 1 ac. prop.
10 cc.	»	»
20	12,9	13,2
30	20	20,4
40	27,9	28,2
50	36,2	36,4
60	45,3	45,3
70	54,5	54,9
80	66,2	66,4
90	80,7	80,8
100	100	100

Il nous a donc été possible, par la méthode de Duclaux, de déceler l'acide formique et l'acide propionique, ces acides étant à une dilution telle que la liqueur primitive réduisait à peine le nitrate d'argent ammoniacal et ne permettait aucune recherche directe de l'acide propio-

nique. Pour avoir confirmation du résultat nous avons, en milieu alcalin, ramené 20 litres de cultures à 500 cc que nous avons ensuite traités par la méthode indiquée plus haut.

ACIDE FORMIQUE. — Le distillat réduisait le nitrate d'argent avec, à chaud, formation d'un miroir d'argent métallique. Il donnait en présence de HgCl_2 après chauffage un précipité formé par des cristaux caractéristiques en forme de croix de malte (Denigés).

ACIDE PROPIONIQUE. — Le distillat traité, comme il a été indiqué, après destruction de l'acide formique a donné un précipité de propionate d'argent du poids de 0 gr. 0102. Nous avons recommencé une nouvelle série de cultures et finalement le poids de propionate d'argent total obtenu a été de 0 gr. 0226 qui nous a donné 0 gr. 0134 d'argent, soit 59,2 % au lieu de 59,67 % calculés.

c) *Autres substances volatiles.* — Dans le distillat obtenu lors de la réduction au tiers du liquide de culture en milieu alcalin, nous n'avons obtenu en quantité pondérable qu'un seul produit volatil, l'ammoniaque.

En résumé, nous avons isolé des cultures de pyocyanique sur asparagine :

ACIDES FIXES { Acide fumarique
Acide malique

ACIDES VOLATILS { Acide formique
Acide acétique

AUTRES PRODUITS VOLATILS : Ammoniaque

Mécanisme de la dégradation de l'asparagine

C'est dans le travail d'Arnaud et Charrin que l'on rencontre pour la première fois une explication partielle de la transformation bactérienne de l'asparagine. Ces auteurs constatent en effet l'hydrolyse rapide sous l'influence d'un phénomène diastasique de l'amide en acide aspartique. Plus tard Harden explique la production d'acide succinique aux dépens de l'acide aspartique par le coli, par une réduction directe sous l'influence de l'hydrogène dégagé lors de l'attaque du glucose mis à la disposition du microbe, et cela, presque quantitativement. Il y aurait dans ce cas élimination du groupement NH^2 à l'état de NH^3 et remplacement de ce groupement par de l'hydrogène. Il s'agit là d'un mode d'attaque tout à fait particulier. Habituellement la libération de l'ammoniaque se fait, comme nous le verrons, en deux temps : hydrolyse de la fonction amide et attaque de la fonction amine. Arnaud et Charrin comme nous venons de le dire ont vu que la libération de l'azote amidé était due à l'intervention d'un phénomène diastasique. Ce fait très général a été confirmé par Lang qui signala la formation d'ammoniaque¹ par les tissus aux dépens de l'asparagine, puis par Effront d'une part et Pringsheim d'autre part, qui constatèrent l'existence chez la levure d'une désamidase. L'année précédente, Neuberg et Rosenberg avaient déjà signalé qu'au cours de la putréfaction, l'acide glutamique et

¹. Quantité d'ammoniaque qui, pour la muqueuse intestinale autolysée du porc, dépasse d'après V. Fürth et Friedmann, la quantité que peut fournir l'azote amidé. Il faut donc admettre l'attaque de l'amine.

l'acide aspartique étaient respectivement transformés en acide butyrique et propionique par désamination et décarboxylation simultanées. Borchardt¹ ayant isolé de son côté l'acide succinique parmi les produits de putréfaction de l'asparagine, admit que cet acide précède la formation de l'acide propionique qui en dérive par perte de CO² suivant le schéma :



Le travail de Borchardt fut, dès 1909, confirmé par Neuberg et Cappezuoli qui montrèrent en outre que l'asparagine donne de meilleurs rendements que l'acide aspartique, sans doute disent-ils parce que l'asparagine constitue un meilleur aliment pour les bactéries. Il y a peut-être là, car l'asparagine est utilisée à l'état d'aspartate d'ammoniaque, une confirmation du fait que nous avons signalé de la supériorité comme aliment des sels ammoniacaux sur les autres sels.

Enfin, récemment Blanchetière dans son travail sur le fluorescent a apporté une sérieuse contribution en faveur de la théorie émise en 1911 par Knoop, E. Neubauer et K. Fromherz suivant laquelle le premier stade de la transformation de l'amino-acide serait l'hydrate d'imino-

¹. Dans une publication parue en 1909, à côté du travail de Neuberg et Cappezuoli, F. Ehrlich appliquant à la formation d'acide succinique sa théorie de la fermentation alcoolique des amino-acides, montra qu'en ce qui concerne la levure cet acide est formé aux dépens de l'acide glutamique et non de l'acide aspartique. Les processus de formation d'acide succinique au cours de la fermentation alcoolique et au cours de la putréfaction sont donc différents.

acide correspondant, lequel fournirait l'acide cétonique, et l'a complétée en montrant que la forme œnolique de l'acide aboutissait à la production d'acide non saturé, l'acide fumarique en l'espèce présent dans les cultures à côté de l'acide succinique et de l'acide malique.

Nous avons à notre tour étudié la marche de la dégradation de l'asparagine par le bacille pyocyanique. Pour cela nous avons dosé simultanément l'acidité totale du milieu de culture, l'acidité Soerensen et l'ammoniaque (méthode de Folin) formées au bout d'un temps variant de 24 heures à 8 jours.

	ACIDITÉ en SOUDE $\frac{N}{10}$ pour 5 cc. de culture ¹	ACIDITÉ Soerensen en soude $\frac{N}{10}$ pour 5 cc. de culture	QUANTITÉ de NH_3 par litre correspondant à l'acidité Soerensen	QUANTITÉ de NH_3 trouvée par litre
Départ . . .	+ 0 cc. 65	1 cc. 7	0 gr. 578	0 gr. 025
Au bout de 24 h.	+ 0 - 6	2 - 3	0 - 782	0 - 514
Au bout de 48 h.	— 0 - 5	3 -	1 - 042	1 - 06
Au bout de 8 jours	— 0 - 3	2 - 4	0 - 816	0 - 810

La comparaison entre les nombres exprimant l'acidité Soerensen et ceux donnant la quantité d'ammoniaque permet de voir que l'hydrolyse se fait en deux temps : hydrolyse rapide de la fonction amide (le chiffre d'acidité Soerensen exprimé en ammoniaque est plus grand que le chiffre d'ammoniaque trouvé) et hydrolyse plus lente du groupement aminé (le chiffre d'acidité Soerensen exprimé

¹. Neutralité à la phtaléine. Le signe positif indique que les cultures étaient acides à ce réactif, le signe négatif, alcalines. Dans ce dernier cas, la neutralité était obtenue avec $SO^4H^2 \frac{N}{10}$.

en ammoniacque tend à devenir égal au chiffre d'ammoniacque trouvé). Puis l'asparagine ayant été totalement transformée en sels ammoniacaux (le chiffre de l'acidité Soerensen exprimé en ammoniacque demeure égal au chiffre d'ammoniacque trouvé), il y a consommation de ces sels marquée par une diminution de la réaction alcaline, de l'acidité Soerensen et de la quantité d'ammoniacque. Ceci est tout à fait conforme à ce que Blanchetière a montré pour le fluorescent. La marche de l'acidité Soerensen d'autre part rappelle celle consignée dans des tableaux de Frouin et M^{lle} Ledebt au sujet de divers microbes.

Ainsi l'asparagine fournissant à la fois le radical et la base est transformée totalement en sels ammoniacaux.

Le problème qui se pose maintenant est de savoir quels sont les termes de passage entre l'amide et l'acide organique, le plus simple que nous ayons rencontré, l'acide formique.

a) Nous possédons un certain nombre de stades intermédiaires, nous avons déterminé en effet les acides malique, fumarique et propionique.

b) D'autre part et bien que nos efforts pour déceler ce corps dans les cultures de pyocyanique soient restés vains, nous noterons que l'acide succinique (Brasch, Borchardt, Neuberg, Blanchetière etc.), semble un produit constant de la putréfaction de l'asparagine, et que le fluorescent qui est très voisin du bacille de Gessard donne des acides acétique et malonique (Blanchetière) le fait que nous n'ayons pas mis en évidence ces divers composés ne suffit pas pour rejeter l'hypothèse qu'ils marquent des stades dans la dégradation de l'asparagine par le microbe qui nous occupe. L'absence d'acide succinique dans les

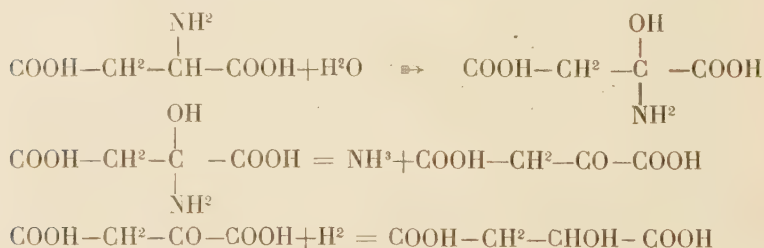
milieux de cultures s'explique fort bien par le fait que cet acide est un aliment, l'un des meilleurs même pour le pyocyanique. Mais une telle interprétation valable à la rigueur pour l'acide acétique l'est-elle pour l'acide malonique ? C'est un point qui reste à élucider.

De l'asparagine au gaz carbonique existent donc ou peuvent exister :

Aspartate d'ammoniaque, acide malique, acide succinique et acide fumarique, acide malonique, acide propionique, acide acétique, acide formique.

ORIGINE DE L'ACIDE MALIQUE. — Cette origine, depuis les travaux de Knoop, Neubauer et K. Fromherz, Blanchetière, doit être cherchée dans la transformation de l'amine en hydrate d'imino-acide qui, par perte d'ammoniaque, se transforme en acide cétonique, lequel donne par réduction de l'hydroxy-acide.

En l'espèce, l'acide aspartique donne l'acide oxalacétique et l'acide malique :



ORIGINE DE L'ACIDE SUCCINIQUE (hypothétique). — L'origine de l'acide succinique peut être cherchée, soit dans la réduction directe de l'aspartate d'ammoniaque, comme cela a lieu, ainsi que l'a montré Harden pour le coli :



soit dans la fixation d'une molécule d'hydrogène sur l'acide malique avec élimination d'eau (Schutzenberger-Blanchetière).



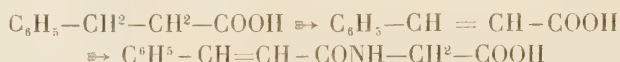
La première réaction semble peu vraisemblable : Harden l'a obtenue en milieu sucré et l'attribue à l'action directe de l'hydrogène formé dans le milieu de culture. La seconde a, pour elle, l'avantage d'expliquer la disparition de l'acide malique dans les vieilles cultures. Elle a été vérifiée expérimentalement par Blanchetière qui a constaté avec le fluorescent poussant sur milieu au malate d'ammoniaque la production d'acide succinique avec un rendement de 40 %. Il serait possible que certaines races de bacille pyocyanique donnent de l'acide succinique en quantité appréciable.

Blanchetière a signalé le fait que certaines races de fluorescent produisent à la fois de l'acide succinique et de l'acide fumarique, tandis que d'autres donnent presque exclusivement de l'acide succinique. Emmerling et Reiser, de leur côté, disent avoir rencontré des races de bacille de Flügge ne fournissant que de l'acide fumarique. On voit qu'il serait imprudent de rejeter l'acide succinique des produits normaux de dégradation de l'asparagine, sous le seul prétexte que nous n'avons pas pu le mettre en évidence.

ORIGINE DE L'ACIDE FUMARIQUE. — La réduction de la forme oenologique de l'acide oxalacétique conduit à l'acide fumarique :



C'est là l'origine la plus vraisemblable de l'acide. Mais il y en a d'autres possibles. Blanchetière a constaté la formation de l'acide fumarique aux dépens de l'acide succinique par un mécanisme non-élucidé. Dakin (1) a obtenu chez les animaux la cynamyglycine après injection d'acide phenylpropionique :

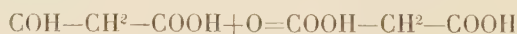


et a constaté que l'acide cinnamique se formait non pas directement, mais bien par l'intermédiaire de l'acide hydroxylé, la réaction étant d'ailleurs réversible la transformation réciproque des deux acides dans l'organisme ayant été constatée. Par un mécanisme analogue on conçoit que l'acide malique pourrait fournir de l'acide fumarique, et réciproquement. Il nous faudra procéder à de nouvelles expériences pour éclaircir ce point.

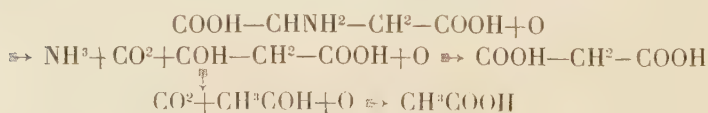
ORIGINE DE L'ACIDE MALONIQUE (hypothétique). — Cet acide trouvé à l'état de traces par Blanchetière aurait vraisemblablement, selon nous, son origine dans la décarboxylation de l'acide oxalacétique.



La semialdéhyde malonique étant oxydée ensuite :

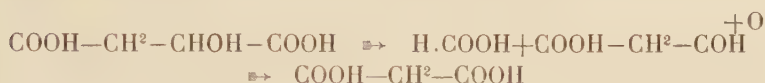


Dakin (2) a d'ailleurs obtenu de l'acide malonique par oxydation de l'asparagine au moyen de l'eau oxygénée :



en outre, il se formait de l'acide acétique et des traces d'acide formique.

Par un processus un peu différent décrit par Harden développant les travaux d'Ehrlich à propos de la formation d'acide succinique lors de la fermentation alcoolique, on pourrait prendre comme origine de l'acide malonique l'acide malique :



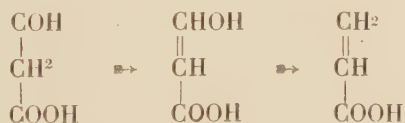
ORIGINE DE L'ACIDE PROPIONIQUE. — Il est bien difficile d'admettre que l'origine de l'acide propionique puisse être soit la semialdéhyde malonique, soit l'acide malonique, ces corps, réduits fourniraient l'acide hydracrylique



corps facilement décomposable en eau et en acide acrylique. Il faudrait alors admettre une transformation de l'acide acrylique en acide propionique par fixation d'hydrogène

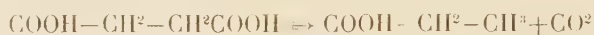


La semialdéhyde malonique pourrait être aussi transformée en son tautomère l'acide β -oxyacrylique selon l'une des hypothèses émises par Blum et Woringer pour expliquer la formation d'acide lactique aux dépens de l'acide propionique. Cet acide oxyacrylique par départ d'oxygène serait transformé en acide acrylique



La décarboxylation de l'acide fumarique conduirait également à l'acide acrylique. Mais, cet acide n'a jamais été isolé dans les produits de putréfaction de l'asparagine ou des corps en dérivant. Il y aurait lieu, pourtant, d'essayer d'en faire attaquer le sel ammoniacal par le bacille pyocyanique.

Borchardt, ainsi que nous l'avons dit, donne comme origine à l'acide propionique l'acide succinique. Il y aurait simplement départ d'un CO^2



Cette réaction, la plus vraisemblable, indiquerait, puisque nous avons isolé l'acide en C^3 , l'existence transitoire dans nos cultures de l'acide succinique. Ceci est d'autant plus probable que, lorsque nous avons fourni au pyocyanique du succinate de soude comme substance fermentescible, nous avons obtenu un mélange d'acide propionique et d'acide formique. Nous reviendrons sur cette question.

Enfin, nous devons, nous inspirant d'un travail de Fitz, mentionner la production possible d'acide propionique aux dépens de l'acide malique qui est transformé par le ferment propionique de cet auteur alors que l'acide succinique n'est pas touché.

ORIGINE DE L'ACIDE ACÉTIQUE (hypothétique). — Neuberg, en collaboration avec Jamakawa, a montré que l'acide oxalacétique donnait par putréfaction un mélange d'acide acétique et d'acide formique :



On peut admettre aussi la production d'acide acétique soit par oxydation de l'aldéhyde provenant de la

décarboxylation de la semialdéhyde malonique suivant le schéma de Dakin :

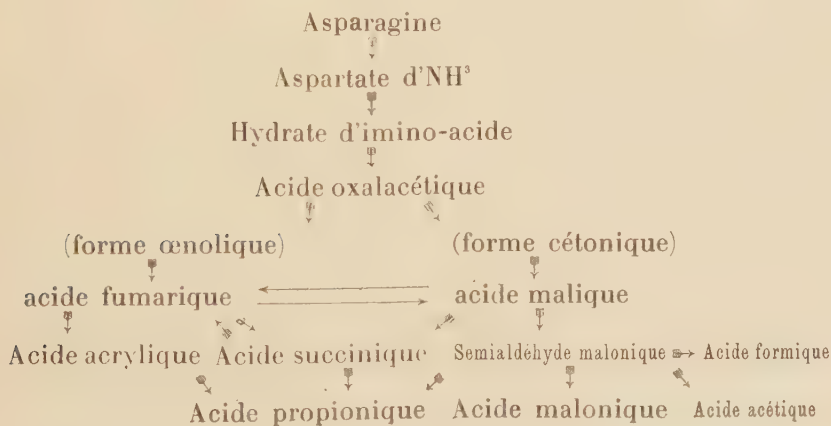


soit même par décarboxylation de l'acide malonique



ORIGINE DE L'ACIDE FORMIQUE. — Cet acide est un produit certain de la dégradation de l'asparagine. Nous l'avons rencontré après Neuberg et Cappezuoli. Nous venons de voir que Neuberg l'a trouvé à côté de l'acide acétique dans la putréfaction de l'acide oxalacétique. Nous pensons qu'il pourrait bien être un témoin de la transformation de l'acide malique en acide malonique, suivant le schéma indiqué plus haut. Mais de nouvelles expériences sont nécessaires pour élucider ce point.

La dégradation de l'asparagine, par le bacille pyocyanique, peut donc se concevoir d'après le schéma suivant :



Certains des termes de passage bien que non isolés sont vraisemblables. Nous avons discuté les possibilités à propos de chaque acide. Il reste à savoir, ce que peuvent devenir les derniers termes. L'acide formique, l'acide acétique et l'acide propionique utilisés en dernier ressort par le bacille lorsqu'il n'a pas d'autres sources de carbone donnent des produits élémentaires : CO^2 , H^2 , H^2O et carbures. L'acide malonique peut servir de point de départ pour de nouvelles synthèses ; les travaux de Ringer ont montré, en effet, la production de sucre par l'organisme animal aux dépens de cet acide. Peut-être faut-il chercher là la raison de son absence dans les cultures que nous avons examinées et sa faible proportion dans les cultures de fluorescent.

CHAPITRE IV

L'attaque de la source de carbone

Il y a longtemps que l'on s'est préoccupé de déterminer l'échelle des réactions qui conduisent d'une source carbonée aux acides et aux alcools de constitution simple que l'on rencontre à la fin d'une culture. Les travaux les plus importants ont été entrepris au sujet de la fermentation alcoolique : nous n'en parlerons pas, nous réservant seulement au cours de la discussion sur la valeur ou la signification des produits résiduels de faire appel aux notions qu'une série de recherches remarquables nous ont acquises.

C'est à Pasteur qu'il faut remonter pour trouver une étude systématique de la transformation, sous l'influence de microbes isolés à l'état pur, et cultivés dans des milieux synthétiques, des substances ternaires en acides organiques butyrique ou lactique. Un peu plus tard, en 1878-1882, une série de travaux de Fitz nous apportent des résultats précieux. Malheureusement, les fermentations souvent n'étaient pas produites par des micro-organismes purs : néanmoins, Fitz put attribuer à des microbes déterminés l'origine de la transformation des hydrates de carbone, alcools ou sels organiques examinés,

en acides organiques et alcools. C'est une suite d'études analogues que Frankland, vers 1890, et ses élèves, poursuivent avec l'action du bacillus éthaceticus sur la glycérine et d'autres substances ternaires, puis nous voyons naître à partir de 1891, les monographies se continuant jusqu'à ces dernières années de Perdrix (bac. amylozyme 1), Grimbert (bac. orthobutylicus 1, pneumobacille de Friedländer 2, bac. lactis aérogènes 3), Péré (coli 1), Gayon et Dubourg (ferment mannitique), Kayser (ferment lactique), Bertrand (bact. du Sorbose), Harden (coli), Voisenet (bac. amaracrylus), etc.

Technique. — Pour étudier l'action du bacille pyocyanique sur la source carbonée, nous nous sommes servis du milieu suivant :

NH ⁴ Cl	2 gr.
Substance carbonée organique	5 —
Phosphate monopotassique	1 —
Sulfate de magnésie	1 —
Eau q. s. pour	1.000 —

où la substance organique, était soit un hydrate de C., soit un acide organique à l'état de sel de Ca ou de Na, soit un alcool. Ainsi, éliminons-nous la possibilité de produits organiques provenant du métabolisme de la source d'azote.

Le liquide de culture a été traité suivant la technique indiquée au chapitre précédent.

RÉSULTATS

Culture sur Glucose

Le départ de la culture fut assez pénible, et si nous avons observé au bout de trois jours un trouble uniforme

assez intense, jamais nous n'avons constaté de voile. Le microbe repiqué sur milieu peptoné a donné une culture avec les caractères classiques. L'examen microscopique nous a montré, en outre, qu'il n'y avait pas eu de contamination.

a) *Acides fixes*. — La recherche des acides fixes est demeurée constamment négative. Bien que nous nous soyons, en particulier, attaché à dépister l'acide lactique, jamais même dans le produit de l'évaporation de l'extrait éthéré nous n'avons pu obtenir une réaction de Berg ou de Hopkins positive.

b) *Acides volatils*. — L'acidité volatile totale observée a été faible, un peu plus élevée pourtant qu'avec les cultures sur asparagine : 8 cc. 2 d'eau de chaux diluée au 1/10 ont saturé les acides contenus dans 110 cc. de culture. Ces acides sont vraisemblablement constitués par un mélange de une partie d'acide formique pour deux parties d'acide acétique :

	Pourcentage de l'acide passé à la distillation	Calculé pour 1 ac. formique 2 ac. acétique
10 cc.	5,7	»
20	14	14,2
30	21,6	21,9
40	30	30,4
50	38,8	38,7
60	48,1	48
70	58,2	58,2
80	69,6	69,4
90	82,9	82,8
100	100	100

Nous avons eu en concentrant 2 litres de cultures à 50 cc, dans le distillat de ces 50 cc la réduction du nitrate d'argent avec formation à chaud d'un miroir d'argent métallique, caractéristique de l'acide formique. La dilution de l'acide acétique était encore telle qu'il ne fallait pas songer à essayer d'obtenir une confirmation des résultats obtenus par la méthode de Duclaux.

c) *Autres substances volatiles.* — Le distillat fait en milieu alcalin a donné, par addition de soude et d'iode, la réaction de l'iodoforme. Comme ce distillat n'était pas réducteur, qu'il ne recolorait pas la fuchsine décolorée par le bisulfite de Na, qu'il ne donnait pas la réaction de Legal, l'existence d'acétone et d'aldéhyde doit être rejetée. Nous pensons donc qu'il s'agit de faibles quantités d'alcool éthylique.

Cultures sur lévulose

a) *Acides fixes.* — Nous avons obtenu de l'extrait éthéré un résidu sirupeux, peu important, donnant la réaction de Berg et celle de Hopkins. Il s'agit évidemment d'acide lactique, ce qui est confirmé par l'analyse du sel de zinc.

$$\begin{aligned}\text{Lactate anhydre} &= 0,0342 \text{ gr.} \\ \text{Zn O} &= 0,0115 \text{ gr.} \\ \text{Zn O \%} &= \frac{0,0115 \times 100}{0,0342} = 33,6 \text{ (théorie 33,4)}\end{aligned}$$

b) *Acides volatils.* — Il n'y aurait qu'à répéter ce que nous avons dit à propos du glucose. Le dosage de l'acidité volatile nous a conduit à un mélange d'acide formique et d'acide acétique, en quantité égale.

c) *Autres substances volatiles.* — Ici encore, comme pour le glucose, nous avons décelé de faibles quantités d'un

corps non réducteur, donnant la réaction de l'iodoforme et que nous pensons être l'alcool éthylique.

Cultures sur glycérine

a) *Acides fixes*. — Fitz (1) a signalé autrefois la formation d'acide succinique aux dépens de la glycérine. La recherche de cet acide et de l'acide lactique est demeurée constamment négative.

b) *Acides volatils*. — La détermination de la nature des acides volatils par la méthode Duclaux donne ici des résultats peu satisfaisants. On est conduit à des chiffres s'éloignant d'une façon appréciable des tables publiées. Pourtant l'impression est que l'on a affaire à un mélange d'acide butyrique et d'acide acétique. Mais le distillat est nettement réducteur. Nous avons donc d'abord cherché l'acide formique et cette recherche (réduction du nitrate d'argent, formation du précipité cristallin par HgCl^2 à l'ébullition) a été *positive*.

L'acide formique détruit par ébullition avec l'oxyde de mercure, nous avons saturé exactement par le carbonate de soude le liquide débarrassé du mercure, et concentré à froid, dans le vide sur CaCl^2 . Les cristaux obtenus essorés, recristallisés, puis la quantité en étant trop faible pour permettre l'analyse, examinés qualitativement. La solution aqueuse donnait avec le perchlorure de fer une réaction rouge et quelques cristaux chauffés en présence d'un peu d'acide arsénieux ont dégagé une odeur faible, mais nette de cacodyle. Il s'agit donc d'*acide acétique*.

Les eaux mères, acidifiées et redistillées, ont été traitées par l'eau de baryte, puis le nitrate d'Ag suivant la technique

indiquée. Un précipité de sel d'argent a été obtenu, soumis à l'analyse, il a donné les résultats suivants :

Poids de sel d'argent	= 0,0091 gr.
Argent contenu dans le sel	= 0,0051 —
Argent %	= 56 (théorie = 55,38)

Le sel d'argent est donc celui de l'acide butyrique. Le chiffre de 56 % est un peu fort, mais il faut tenir compte que nous analysions un poids faible de substance. Peut-être, en outre, restait-il un peu d'acétate.

c) *Autres substances volatiles.* — Le distillat alcalin a donné la réaction de l'iodoforme.

Cultures sur succinate de soude

a) *Acides fixes.* — L'extrait éthéré n'a laissé comme résidu qu'une substance résineuse. Nous n'avons trouvé ni acide lactique, ni acide malique, ni acide fumarique.

b) *Acides volatils.* — Le distillat nettement réducteur donne à chaud en présence de nitrate d'argent un dépôt d'argent métallique. En outre nous avons observé avec HgCl_2 le précipité cristallin caractéristique de l'acide formique. Cet acide détruit, le liquide concentré et traité suivant la technique indiquée a donné un dépôt net de sel d'argent. Ce sel a été analysé et nous avons trouvé :

Poids de sel d'argent	= 0,0080 gr.
Argent contenu dans le sel	= 0,0048 —
Argent %	= 60 %

Ce qui correspond à l'acide propionique (59,67 % d'Ag).

c) *Autres substances volatiles.* — Il existe des traces d'alcool éthylique.

Cultures sur citrate de soude

a) *Acides fixes*. — La recherche des acides fixes a donné un résultat négatif. Une fois pourtant, nous avons obtenu une réaction de Hopkins faiblement positive. L'acide lactique est donc peut-être présent.

b) *Acides volatils*. — Voici le résultat d'une détermination de la nature des acides volatils par la méthode de Duclaux :

Pourcentage d'acides passés à la distillation	Calculé 1 partie d'ac. formique, 1 d'ac. acétique
6,5	6,6
17,3	18,7
21,3	21,2
28,9	29,2
37,7	37,6
46,7	46,8
56,7	56,8
68	68,2
82,1	82
100	100

Les réactions complémentaires déjà exposées ont montré qu'il s'agissait bien d'acide formique et d'acide acétique.

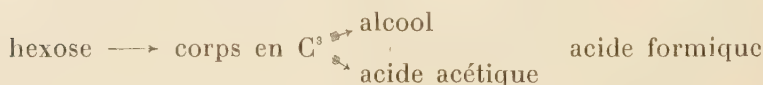
c) *Autres substances volatiles*. — Les résultats ont été complètement négatifs.

Mécanisme de dégradation de la source carbonée

DÉGRADATION DES HYDRATES DE CARBONE. — Nous nous occuperons d'abord de la dégradation des hexoses utilisés comme substance fermentescible. Dans les cultures sur

glucose et lévulose nous avons trouvé constamment l'acide formique et l'acide acétique. L'acide lactique a été rencontré dans les produits fixes provenant du dédoublement du lévulose. Nous verrons que c'est un produit de déchet : mais il doit exister un intermédiaire en C^3 dont l'acide lactique est le témoin. Enfin, avec les deux hexoses il semble bien qu'il y ait formation d'alcool éthylique, en quantité malheureusement trop faible pour qu'on puisse songer à une détermination précise.

Nous admettons donc des sources à l'acide formique les intermédiaires suivants :



DÉDOUBLEMENT DES HEXOSES. — Le sucre se dédouble-t-il immédiatement en 2 molécules renfermant 3 atomes de carbone, ou au contraire, y a-t-il des intermédiaires en C^5 , C^4 etc., c'est-à-dire, suivant l'hypothèse de Loeb (1), la décomposition des sucres se fait-elle par un processus inverse de celui qui préside à leur synthèse en partant de l'aldéhyde formique ?

Nous examinerons d'abord pour répondre à cette question les transformations que font subir aux deux hexoses expérimentés les réactifs de composition chimique connue, ou les agents physiques.

a) *Glucose*. — L'action des alcalis, seuls, a été étudiée, d'abord par Hoppe-Seyler, puis plus tard par Meisenheimer. Ce dernier savant a vu que si, à une solution normale de soude on ajoute 2 à 5 % d'hexose, on obtient un mélange d'acide lactique, d'acide formique et d'hydro-

xyacides renfermant 4 à 6 atomes de C. Pinkus (1898), Nef (1984-1907) obtiennent par action des alcalis un corps qui, en présence de phénylhydrazine donne l'ozazone du méthylglyoxal. Cette ozazone peut être obtenue, soit avec le méthylglyoxal, soit avec l'acétol, soit avec l'aldéhyde lactique. Le méthylglyoxal peut lui-même être considéré comme dérivé de la dioxyacétone ou de l'aldéhyde glycérique, Nef, Buchner et Meisenheimer, Buchner, Meisenheimer et H. Schade admettent que dans les expériences de Pinkus et de Nef, le premier produit formé est l'aldéhyde glycérique. D'autre part Dakin et Dudley (1) ont obtenu par distillation d'une solution de glucose en présence de phosphate de soude, le méthylglyoxal.

L'action de la lumière sur le glucose en milieu alcalin peut également fournir des renseignements. Duclaux a vu dans ces conditions la transformation de l'hexose en acide lactique.

Ranc, dans sa thèse, signale la difficulté de l'attaque du glucose par les rayons ultra-violets. Il y a formation de CO, d'acides et de corps aldéhydiques. J. Bielecki et Wurmser, à propos de l'action de la lumière ultra-violette sur l'amidon, signalent la présence de pentoses dans les produits de dégradation, on peut admettre qu'ils dérivent du glucose préalablement formé.

Enfin, à l'aide des effluves, Loeb (2) a obtenu, aux dépens du glucose, de l'arabinose, ce qui lui fait concevoir le schéma :



b) *Lévulose*. — Hlasiwetz et Habermann, Kiliani (1), Herzfeld obtiennent par action combinée du chlore et du

brome sur ce sucre de l'acide glycolique et de l'acide trioxybutyrique. Hönig, par action du brome seul, de l'acide oxalique et de l'acide trioxybutyrique. L'attaque, par l'acide azotique a donné à Kiliani (2) un mélange d'acides oxalique, formique, glycolique et tartrique, et le permanganate en liqueur sulfurique à l'ébullition, à Perdrix (2) du CO^2 et de l'acide formique.

En présence de soude diluée à 40° , l'oxyde de cuivre hydraté oxyde le fructose et le transforme d'après Nef en CO^2 , acides formique, glycolique, oxalique, glycérique, érythronique, gluconique et mannonique.

L'eau oxygénée a permis à Morrel et Crofts de transformer le lévulose en acides glyoxylique, glycolique, trihydroxybutyrique et à Buchner, Meisenheimer et H. Schade d'isoler les acides formique, glycolique, trihydroxybutyrique et des acides hexoniques. Ces auteurs n'ont rencontré, ni acide acétique, ni acide lactique, ni acide oxalique. Il y aurait formation préliminaire d'aldéhyde glycérique qui se décomposerait en 3 molécules d'aldéhyde formique qui, oxydées donneraient de l'acide formique.

Berthelot et André ont obtenu par action de HCl sur le lévulose de l'acide formique, et par action de l'acide phosphorique du furfurol. L' HCl à 9 % a donné à Conrad et Guthzeit de l'acide lévulique.

Les rayons ultra-violets ont une action intense sur le fructose. Bierry, V. Henri et Ranc, confirmés par Berthelot et Gaudechon ont obtenu la transformation de l'hexose en CO , et aldéhyde formique en même temps qu'une augmentation considérable de l'acidité peut être constatée (Ranc).

L'ensemble des travaux parus sur la décomposition des hexoses est, en somme, favorable à l'hypothèse de Loeb. La présence constante dans nos cultures d'acide formique serait un argument de plus.

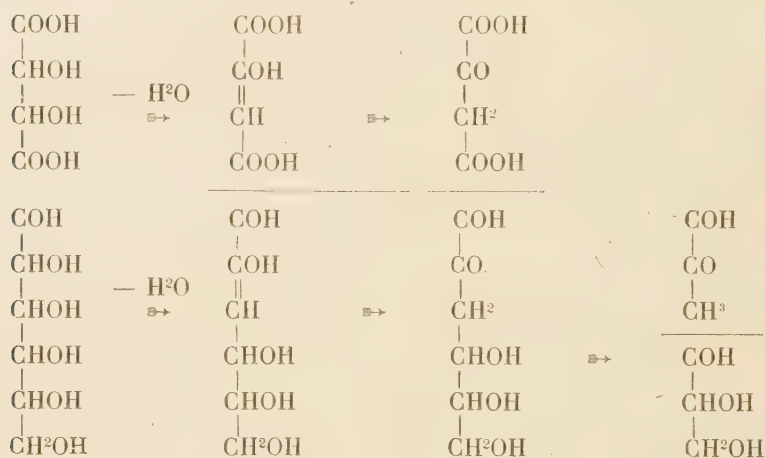
Malheureusement, tous nos efforts pour isoler les pentoses ou leurs dérivés ont échoué. Jamais, non plus, nous n'avons dans nos cultures trouvé les réactions caractéristiques, avec la phloroglucine, l'orcine ou la naphtorésorcine. D'autre part, au cours de ses études sur la fermentation alcoolique, Loeb (3), n'a jamais pu mettre en évidence les produits intermédiaires qui nous occupent, même en ajoutant de l'aniline, de l'ammoniaque, de la phloroglucine qui auraient dû, en se combinant avec ces produits permettre de les isoler.

Nous pouvons aussi, apporter à l'appui de l'hypothèse du dédoublement direct de l'hexose en 2 molécules en C^3 , une série de travaux relatifs à la transformation des sucres en C^5 dans l'organisme animal : Levene et Meyer obtiennent par action des leucocytes sur les hexoses de l'acide lactique, Dakin et Dudley (2) par injection aux animaux constatent la même transformation Embden et Kraus, Embden et Oppenheimer dans le foie perfusé isolent de l'acide lactique provenant du dédoublement du glucose et du glycogène. Jamais ces auteurs n'ont décrit de produits en C^5 ou en C^4 .

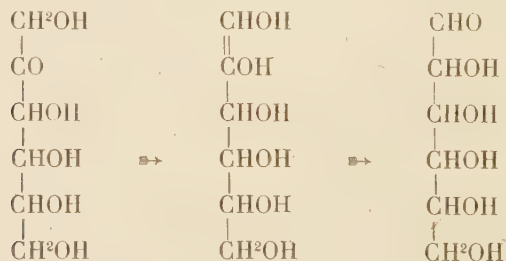
Pour toutes ces raisons⁴ nous croyons devoir admettre le dédoublement immédiat de l'hexose en deux corps

⁴. Raisons auxquelles on pourrait peut-être ajouter la suivante : quelle preuve a-t-on que les pentoses ne sont pas des produits de synthèse formés aux dépens des produits de décomposition des H de C.

en C³ suivant le schéma de Wohl réalisé par analogie avec ce qui se passe lors de la transformation de l'acide tartrique en acide oxalacétique étudiée par cet auteur :



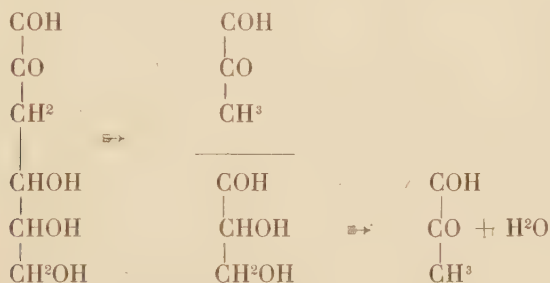
On aboutit ainsi, comme nous le verrons plus loin, à l'acide lactique, corps que nous avons rencontré dans nos cultures sur lévulose. Ce dernier sucre est peut-être avant le dédoublement, partiellement transformé en glucose par une réaction analogue à celle observée par Lobry de Bruyn en faisant agir les alcalis dilués sur le fructose :



Ce qui n'a rien d'impossible étant donnée l'existence de ferments œnolisants.

ORIGINE DE L'ACIDE LACTIQUE. — Ce corps manque souvent. Est-ce un produit exceptionnel, est-ce un produit nécessaire qui disparaît aussitôt formé ? Il est difficile de répondre d'une façon certaine à la question. Pourtant, le fait qu'il nous a été impossible d'obtenir des cultures convenables sur milieu au lactate de Na Chlorure d'ammonium est un argument en faveur de la première hypothèse.

L'acide lactique est surtout intéressant comme témoin, sa présence ne pouvant s'expliquer que par une formation préalable de méthylglyoxal¹. C'est à ce corps, d'ailleurs, que l'on aboutit dans le schéma de Wohl :



Il a été rencontré par Fernbach dans les cultures, sur sucre de *Tyrothrix tenuis*, et Jensen a isolé lors de la fermentation alcoolique du glucose, la dioxyacétone que Bertrand pour la première fois avait mise en évidence dans les cultures de la bactérie du Sorbose sur glycérine

¹. En fait, des cultures de pyocyanique sur méthylglyoxal nous ont donné un résidu éthéré présentant une réaction de Hopkins positive. Nous continuons l'étude de cette fermentation.

et qui fut retrouvée depuis par différents auteurs comme produit du métabolisme de microorganismes variés (Fembach, Lemoigne, H. Bierry et E. Portier, etc...). Or, cette dioxyacétone est un générateur de méthylglyoxal : Fernbach a vu qu'elle précédait ce dernier corps dans les cultures de *tyrothrix*. Mais c'est surtout par analogie avec ce qui se passe dans l'organisme, et que nous avons eu l'occasion de signaler, que l'on est amené à admettre l'existence du méthylglyoxal comme produit de la décomposition du glucose.

Cette existence en ce qui concerne le pyocyanique est encore problématique, et l'absence de produits volatils réducteurs suffit, nous ne nous le dissimulons pas, pour créer un doute. Mais Péré (2) cite le fait qu'un *tyrothrix* cultivé à 38° sur bouillon glucose ne donne pas trace de glycérose alors qu'il en produit à 23°. Les termes intermédiaires d'une fermentation peuvent donc passer inaperçus.

Il faudra, pour résoudre la question faire des cultures sur milieu bisulfités¹.

L'aldéhyde glycérique, corps non volatil, précurseur possible du méthylglyoxal, a dans l'organisme animal, donné naissance à l'acide lactique (Embden et Oppenheimer, Loeb [3], Embden, Baldes et Schmitz). Cette aldéhyde, que Péré croyait avoir rencontré, pourrait donc être génératrice d'acide lactique. Jusqu'ici on ne l'a jamais signalée dans les cultures microbiennes où on pourrait la déceler, comme Fernbach et Lemoigne ont cherché à le faire, à l'aide de la réaction de Wohl et Neuberg.

¹. Il y aurait lieu aussi de rechercher au cours des fermentations lactiques la présence du méthylglyoxal par cette méthode.

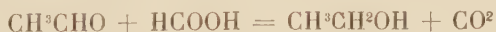
ORIGINE DE L'ALCOOL ET DE L'ACIDE ACÉTIQUE. — Ces deux corps sont des produits constants provenant de la fermentation du glucose et du lévulose par le pyocyanique.

La première idée qui se présente à l'esprit, c'est qu'ils pourraient bien provenir de l'acide lactique. L'hypothèse de la formation d'alcool aux dépens de ce dernier acide a été défendue par Buchner et Meisenheimer qui se basaient entre autres sur les faits suivants :

1° Dans les fermentations on trouve fréquemment de faibles quantités d'acide lactique ; 2° lorsqu'on ajoute au suc de levure de l'acide lactique, celui-ci augmente ou diminue de quantité ; 3° l'augmentation a lieu avec les sucres à fort pouvoir fermentaire, la diminution avec les sucres à faible pouvoir. Au point de vue purement chimique, on pourrait trouver un appui à la théorie de Buchner et Meisenheimer dans une vieille expérience d'Erlenmeyer, reprise par Schade, qui montre que l'attaque de l'acide lactique par l'acide sulfurique conduit à l'acétaldéhyde et à l'acide formique :



Schade, en outre, soumettant le mélange obtenu à l'action du rhodium métallique a obtenu de l'alcool :



Duclaux estimait que l'alcool obtenu dans ses expériences sur les solutions sucrées isolées en milieu alcalin passait par le stade acide lactique. D'autre part, l'alcool a été obtenu par action de bactéries (Fitz [2]) ou des moi-

sissures, (Mazé [1], sur l'acide lactique, Mazé [2 et 3]). Mazé et Ruot ont également obtenu de l'acide acétique aux dépens du lactate de Na par fermentation microbienne. Il est fréquent, en outre, de rencontrer au cours des fermentations, l'alcool et l'acide acétique associés à l'acide lactique (Péré, Grimbert, Kayser, Gayon et Dubourg, Harden) et récemment, à propos d'un fait semblable Peterson et E. B. Fred émettaient l'hypothèse que l'acide acétique provient de l'acide lactique. Mazé (2) a étudié avec soin le phénomène. Il a constaté l'évolution parallèle de 2 processus :



L'origine de l'acide formique est vérifiée par le fait qu'en remplaçant dans les cultures l'acide lactique par l'alcool on trouve des traces d'acide acétique, mais pas d'acide formique. Plus tard, avec Ruot, il a mis en évidence dans les cultures d'oïdium, sur lactate, l'acide pyruvique. Comme produit secondaire, il y avait de l'acide acétique, mais, fait curieux, pas d'alcool.

Nous ne pouvons, en ce qui concerne les fermentations produites par le pyocyanique, admettre une telle origine. L'acide lactique, formé, en somme exceptionnellement, est ainsi que nous l'avons dit mal utilisé par le microbe. On ne peut donc dire que ce soit un produit transitoire rapidement transformé. En outre, comment pourrait se faire sa transformation ? Par décarboxylation :



On aurait ainsi l'alcool, mais l'acide acétique ? La formation aux dépens de l'alcool éthylique ne semble rien moins que certaine. Wirgin a constaté qu'ajouté à des cultures de pyocyanique, l'alcool augmente le poids de culture, et est complètement brûlé.

Il nous semble préférable de revenir au méthylglyoxal. Ce corps peut parfaitement se transformer en acide pyruvique qui, par décarboxylation ainsi que l'a vu Neuberg, donne l'acetaldehyde source d'alcool et d'acide acétique. L'origine de l'acide pyruvique aux dépens des hydrates de carbone bien que niée longtemps par Neuberg est vraisemblable. Fernbach et Schoen (2) qui ont mis en évidence cet acide dans des cultures de levures et d'autres microorganismes, ont constaté que la quantité d'acide pyruvique formée croissait proportionnellement à la quantité de sucre consommé. Nous-mêmes qui n'avons pu trouver l'acide dans des cultures de bac. subtilis sur asparagine, l'avons décelé, à côté de la dioxycétone et du méthylglyoxal dans les milieux glycélinés¹. L'existence transitoire de l'acide pyruvique est donc possible dans les cultures de pyocyanique. La difficulté de sa mise en évidence s'explique par le fait qu'il est transformé assez rapidement, comme nous avons pu nous en assurer. Il suffisait pour cela de cultiver le microbe sur milieu pyruvate de Na-NH⁴Cl. Au bout de 8 jours il y avait formation d'alcool, d'acide acétique, d'acide formique et d'acide

(1) Il nous faut signaler ici que Beijerinck et Folpners ont obtenu l'acide pyruvique aux dépens des acides maliques et fumariques. Mais l'on sait que ces acides peuvent être transformés en acide lactique par les ferments.

lactique. Ce dernier fait semble montrer que dans certains cas l'acide pyruvique contrairement à ce qui se passe dans les expériences de Mazé précède l'acide lactique (1). Ceci n'a rien de surprenant, la réaction, comme cela a lieu dans l'organisme (Dakin [1] Embden et Oppenheimer, P. Mayer) peut être réversible. Un tel mode n'est pas exceptionnel, il a été observé pour d'autres acides : acides diacétique, β -oxybutyrique (Blum, Dakin (2) par exemple).

La genèse de l'alcool et de l'acide acétique aux dépens de l'acide pyruvique a fait l'objet de nombreux travaux. Un exposé de la question par Fernbach et Schoen (4) est paru sur ce sujet et nous y renvoyons pour les détails complémentaires. Schutzenberger et Destrem, Roeser, puis plus tard, Magnus Lévy, Leathes soutiennent que l'acétaldéhyde est un produit intermédiaire de la fermentation alcoolique. Neubauer expose dans un schéma, que l'aldéhyde éthylique doit provenir de l'acide pyruvique par décarboxylation. L'origine de l'acide pyruvique étant l'alanine par l'intermédiaire de l'hydrate d'imino-acide. La décomposition sous l'influence de la carboxylase découverte à ce sujet, de l'acide pyruvique en acétaldéhyde est démontrée par Karczag et Neuberg.

L'acétaldéhyde est d'ailleurs bien un produit normal de la fermentation. Kostytchew l'a montré dans des fermentations avec chlorure de Zn, malgré Neuberg et Kerb, qui se rangeant à l'opinion de Sauton et Trilliat reprise par Buchner, Langheld et Skraup ont prétendu qu'il s'agit d'un produit de réaction secondaire aux dépens de l'alcool. Les fermentations en milieu bisulfite (Mueller-Thurgeau et Osterwalder), ou en milieu sulfite (Conns-

tein et Luedecke) d'ailleurs ont établi, d'une façon définitive que l'on peut obtenir des quantités considérables d'acétaldéhyde. En outre, le travail de Connstein et Luedecke signale un fait important : l'augmentation de la glycérine. Neuberg et M^{lle} Rheinfurt (1 et 3) l'ont confirmé et expliquent l'augmentation de la glycérine par le fait que les opérations de réduction ne pouvant porter sur l'acétaldéhyde, bloquée à l'état de combinaison sulfitique, se portent sur le méthylglyoxal, car pour une molécule d'acétaldéhyde il y a une molécule de glycérine formée.

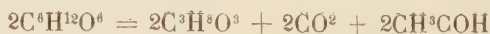
Il est possible d'observer la réduction des aldéhydes en alcool, comme l'ont fait Lintner et Liebig (furfurol en alcool furfurique), Neuberg et Steenbock (aldéhyde valérianique en alcool amylique). Neuberg et Welde (aldéhyde formique en alcool cinnamique). Il n'est donc pas étonnant que Kostytchew et Hubbenet aient décrit la transformation de l'acétaldéhyde en alcool, ceci sous l'influence d'un phénomène diastasique, ce qui a été confirmé par Lebedeff et Griaznoff.

La production d'acétaldéhyde par les microbes et les moisissures, d'autre part, n'est pas un fait nouveau : il nous suffira de rappeler les travaux de Lafar, Fitz, Trillat et Sauton, Martinaud, Mazé (1 et 4), Grey, Neuberg et Nord, Clara Cohen. Nous inspirant de la technique de Neuberg et Nord, nous avons sur les milieux :

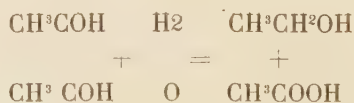
a) Eau	1.000 gr.	b) Eau	1.000 gr.
Glucose	20 —	Glucose	20 —
NH ⁴ Cl	2 —	Asparagine . . .	5 —
Phosph. de K . .	1 —	Phosph. de K . .	1 —
° Sulf. de Mg. . .	1 —	Sulf. de Mg. . .	1 —

auxquels on ajoutait 10 gr. de $\text{CO}^3\text{Ca} + 20$ gr. de sulfite de Naensemencé du pyocyanique. Au bout de 10 jours nous avons, *dans les deux milieux* mis en évidence l'acétaldéhyde par la réaction de Legal, la réaction de Lewin et nous l'avons dosée par le procédé de Neuberg Rheinfurt (2). Comme il s'agit de travaux en cours, nous n'insisterons pas sur les techniques que nous nous proposons de développer plus tard.

De tels milieux sont très alcalins Fernbach et Schœn (1 et 3), ont déjà montré le parti que l'on peut tirer de ce procédé pour isoler les produits intermédiaires de la fermentation alcoolique. D'autres après lui s'en sont servi : Connstein et Luedeke ; Eoff, Linder et Beyer ; Neuberg et Faerber. Ces deux derniers auteurs ont constaté que l'augmentation d'alcalinité correspondait à une augmentation de glycérine et d'acétaldéhyde et à une diminution d'alcool, et Neuberg et Hirsch, pour expliquer le fait que des quantités considérables d'acide acétique prennent naissance dans ces conditions et que la proportion de l'acide acétique à la glycérine formée est de 1 à 3, admettent, d'une part, que la glycérine se fait suivant la réaction

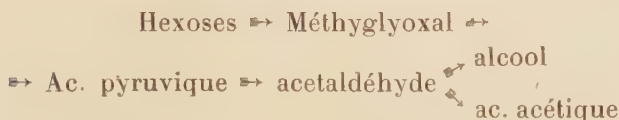


et que l'aldéhyde est transformée, d'autre part, par une réaction de Cannizarro :



Nous ne dirons rien de la question de la glycérine. Le pyrocyanique en fait-il ? Nous ne l'avons pas cherché. Pour ce qui est de l'origine de l'alcool et de l'acide acétique aux dépens de l'acétaldéhyde nous pensons que le schéma précédent l'explique fort bien.

Quoi qu'il en soit, il semble que la dégradation des hexoses par le pyrocyanique se fasse suivant le schéma :



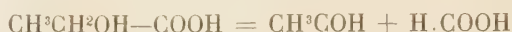
Comme le milieu n'a jamais renfermé traces d'acides aminés, cette production d'alcool et d'acide acétique par l'intermédiaire de l'acétaldéhyde se fait bien *aux dépens des sucres*, conformément aux idées de Fernbach et Schœn (2) et contrairement à l'opinion de Neuberg, opinion d'ailleurs abandonnée peu à peu par son auteur (Neuberg-Nord-Wolff).

ORIGINE DE L'ACIDE FORMIQUE. — Alcool et acide acétique sont vraisemblablement transformés en produits simples CO_2 , H_2O et carbures¹. Nous ne pouvons donc pas voir en eux les précurseurs de l'acide formique. Pour les raisons déjà exposées (parce qu'il est infermentescible, inconstant et qu'il provient de l'acide pyruvique et du méthyglyoxal)

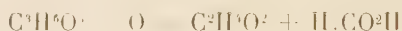
¹. Dakin pourtant admet que, au cours de l'attaque par H_2O_2 de l'acide lactique, l'acide acétique formé donne de l'acide formique :



l'acide lactique ne semble pas devoir être générateur d'acide formique, ainsi que l'exprimerait la formule :



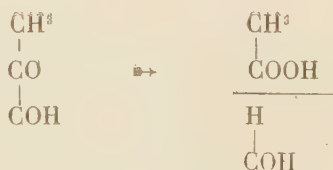
admise par Schade, par analogie avec ce qui se passe lors de l'attaque de l'acide lactique par SO^4H^2 . Les arguments d'ordre purement chimique ne manqueraient pas en faveur de cette hypothèse ; ceux d'ordre biologique non plus. Mazé, entre autre, admet qu'un bacille voisin de bac. *ithaceticosus* de P. Frankland oxyde l'acide lactique de la façon suivante :



et l'on sait que, fréquemment, l'acide formique est un produit secondaire des fermentations butyrique et lactique (Grimbert, Kayser, Harden, etc.).

Pour le pyocyanique l'origine doit être autre — à moins que l'on admette la fermentation par entraînement d'une faible proportion d'acide lactique — mais quelle ?

Nous ne voyons actuellement qu'une seule possibilité, celle qui a été envisagée par Fernbach dans son travail sur la dégradation du glucose par le *tyrothrix tenuis*, la transformation directe de méthylglyoxal en acide acétique et en aldéhyde formique :



L'acide pyruvique dans les mêmes conditions conduirait aux deux acides acétique et formique.

ORIGINE DE L'ACIDE BUTYRIQUE DES CULTURES SUR GLYCÉRINE. — Nous ne parlerons pas, au sujet des cultures sur glycérine de l'origine de l'alcool, de l'acide acétique et de l'acide formique. Cette origine vient, en somme, d'être discutée ; il reste l'acide butyrique. La fermentation butyrique proprement dite peut se faire aux dépens des substances azotées (fermentation de la fibrine par Wurtz, fermentation de l'acide glutamique par Neuberg et Brasch), ou aux dépens des hydrates de carbone ou de certains acides organiques, comme l'acide malique. Les auteurs pensent, en général, qu'il y a transformation préalable en acide lactique (Schutzenberger).



et en fait, il arrive fréquemment que les ferments butyriques divers, étudiés depuis Pasteur et Fitz, donnent à côté de l'acide butyrique, l'acide lactique et transforment en butyrate, le lactate de chaux. Pour le pyocyanique il ne peut être question d'une telle origine¹; ni Fitz, ni nous, n'avons trouvé d'acide lactique dans les cultures sur glycérine; le bacille, nous l'avons vu, n'attaque pas l'acide ;

¹. Duclaux indique dans son traité de chimie biologique la différence essentielle qui existe entre les ferments butyriques de Pasteur, Van Tieghem, qui fermentent le lactate de Ca, et le bacille amylozime de Perdrix ou le bac orthobutylicus de Grimbert qui sont sans action sur ce sel. Ces deux auteurs n'ont pas rencontré d'acide lactique comme produit secondaire, sauf dans un cas de culture sur glycérine (Grimbert) où il y avait des traces de cet acide.

mais ce que nous avons rencontré, c'est l'alcool et l'acide acétique, dont l'origine est vraisemblablement, comme dans les cas des sucres, l'acétaldéhyde. Il nous semble donc logique, en l'espèce, d'admettre le schémade Neucki :



qui fait de l'acide butyrique, un produit de condensation de l'aldéhyde éthylique¹.

ORIGINE DES PRODUITS DE DÉGRADATION DE L'ACIDE SUCCINIQUE. — L'origine de l'acide propionique a été discutée à propos de la dégradation de l'asparagine. Il reste à élucider la question de l'alcool et de l'acide formique. Nous n'avons pas pu isoler l'acide acétique, ce qui fait hésiter à admettre la formation transitoire d'acétaldéhyde, que nous n'avons pas mise en évidence dans les cultures. Mais, Beijerinck et Folpmers ont obtenu de l'acide pyruvique par action des bactéries sur les acides malique et fumarique proches de l'acide succinique. Peut-être l'acide pyruvique provient-il dans tous ces cas de la décarboxylation de la forme cétonique de l'acide oxalacétique formé aux dépens des acides examinés. Une réponse certaine ne peut donc être donnée. Peut-être les cultures faites sur milieux sulfités nous permettront-elles d'isoler l'aldéhyde acétique.

¹. Cette thèse était en cours d'impression lorsqu'est paru dans le Bioch. Zeit. un très important travail de Neuberg et Arinstein résolvant la question de l'origine de l'acide butyrique aux dépens des hydrates de carbone et de la glycérine. Cette origine, c'est l'aldol de l'acide pyruvique.

Pour l'acide formique, nous renvoyons à ce que nous avons dit plus haut.

ORIGINE DES PRODUITS DE DÉGRADATION DE L'ACIDE CITRIQUE. — L'acide acétique semble un produit constant de la dégradation de l'acide citrique (Personne, Macagus, Bosworth et Prucha). L'acide lactique a été signalé par Personne : nous n'avons pas trouvé, dans la bibliographie, mention qu'ont ait déjà obtenu l'acide formique. Nous ne pourrions formuler au sujet de l'origine de ces divers corps que des hypothèses. Mieux vaut poursuivre la recherche des produits intermédiaires.

CHAPITRE V

L'attaque de la source d'azote en présence de l'aliment carboné

Nous avons déjà dit que les aliments azotés comme l'urée ou le glycolle, inattaqués par le microbe dans un milieu qui ne renfermait, outre les dits aliments, que des sels minéraux pouvaient fort bien servir de source d'azote si on leur adjoignait un hydrate de carbone.

Les expériences que nous allons relater étaient toutes faites sur le milieu suivant :

Source de carbone	50 gr.
Source azotée	6 —
Phosphate monopotassique	1 —
Sulfate de magnésie	1 —
Eau q. s. pour	1 000 —

CULTURES SUR GLYCOCOLLE-GLUCOSE. — Le développement est peu abondant, mais net. Voici le tableau de dosage d'une culture de 10 jours :

	Acidité en soude N/10 pour 5 ccm ³ de culture	Poids de NH ₃ par litre de culture
Départ	+ 0 cc. 4	0
3 jours	+ 0 5	1 mgr. 7
5 jours	+ 0 75	9 »
7 jours	+ 0 85	11 7
8 jours	+ 0 90	17 »
10 jours	+ 0 75	16 2

On voit ici nettement, que le glucose a déterminé l'attaque du glycocole. Et nous nous demandons, si dans le cas signalé par Blanchetière à propos du fluorescent, de l'utilisation en présence d'alanine attaquant de l'acide glutamique non-utilisable, il n'y a pas quelque chose de semblable. Ce n'est point chez les amino-acides résistants la source d'azote qui est insuffisante, c'est la *source de carbone*, que l'on fournisse au microbe une bonne source de carbone, l'azote de l'amino-acide servira.

INFLUENCE DE LA NATURE DE L'ALIMENT CARBONÉ SUR LA VITESSE D'UTILISATION DE L'AZOTE. — Ce que nous venons de voir nous a conduit à penser que la nature de l'aliment carboné fourni au microbe devait avoir une influence sur la vitesse d'utilisation de la source d'azote. Nous avons donc ajouté au milieu à asparagine (à 5 p. 1.000) du glucose ou de la glycérine :

	ACIDITÉ en soude N/10 par 5 cc. de culture			ACIDITÉ Sørensen N/40 par 5 cc. de culture			QUANTITÉ de NH ³ par litre correspondant à l'ac. Sørensen			NH ³ trouvé par litre		
	24 h.	48 h.	8 j.	24 h.	48 h.	8 j.	24 h.	48 h.	8 j.	24 h.	48 h.	8 j.
	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
Témoin ensemencé .	+0,65	»	»	1,7	»	»	0,578	»	»	0,023	»	»
Témoin ensemencé .	+0,6	-0,5	-0,3	2,3	3	2,4	0,782	1,042	0,816	0,514	1,06	0,810
Culture sur glycérine .	+0,33	+0,3	+0,6	2,15	2,8	0,75	0,734	0,952	0,26	0,500	0,89	0,2
Culture sur glucose .	+0,5	+1,6	+1,4	2,85	3,2	1,35	0,968	1,983	0,46	0,623	1,335	0,445

Pour avoir une idée nette de la vitesse d'utilisation de l'azote, il eut fallu peser les cultures. Avec le bacille

pyocyannique cela est impossible à cause de la viscosité du milieu. Pour combler cette lacune, nous nous sommes adressé au Subtilis¹, et en même temps, nous en avons profité pour étudier l'action du lévulose. Voici les résultats obtenus après 8 jours d'étuve à 37° (NH³ fourni par l'asparagine 1 gr. 468) :

	ACIDITÉ en soude N/10 par 5 cc. de culture	ACIDITÉ Sørensen en soude N/10 par 5 cc. de culture	POIDS de NH ³ par litre correspon- dant à l'acidité Sørensen	NH ³		POIDS des cultures par litre
				trouvé	utilisé	
Témoin non-ensemencé.	+ 0 cc. 7	2 cm. 3	0 gr. 784	0,050 gr.	0	0
Témoin ense- mencé . .	— 0 3 (alcalin)	2 5	0 850	0,34 + 0,465 de PO ⁴ NH ⁴ Mg	0,153 gr.	0,062 gr.
Culture sur glycérine .	+ 0 cc. 5	2 5	0 850	0,850 gr.	0,618	0,552
Culture sur glucose. . .	+ 0 3	3 »	1 020	1,003	0,468	0 24
Culture sur lévulose . .	+ 0 6	2 8	0 952	0,935	0,533	0,372

Les poids d'ammoniaque par litre calculés d'après l'acidité Sørensen et les poids d'ammoniaque trouvés étant égaux, aux erreurs d'expérience près, tout l'azote de

¹. Nous nous représentons ce qu'à d'arbitraire le fait d'attribuer au pyocyannique des résultats obtenus avec un organisme comme le subtilis. Mais nous désirions pousser plus loin des investigations qu'il était matériellement impossible de poursuivre avec le pyocyannique.

l'asparagine (azote aminé et azote amidé) a été transformé en sel ammoniacal dont une partie a été consommé par le microbe.

La glycérine permet donc une vitesse d'utilisation de l'azote, plus grande que le lévulose, lui-même supérieur au glucose. Mais en réalité ce n'est pas à la glycérine qu'il faut attribuer ces bons résultats. Celle-ci, en effet, donne dans les cultures des produits réducteurs. Parmi ces produits (parfois abondant, parfois à l'état de traces) nous avons pu isoler l'acide pyruvique, que nous avons caractérisé par ses combinaisons avec la phénylhydrazine et la p. nitro-phénylhydrazine. Cet acide pyruvique, ainsi que nous l'avons signalé, provient du méthylglyoxal, lui-même dérivé de la dioxycétone formée aux dépens de la glycérine. Les cultures sur pyruvate de soude à 5 p. 1000, confirment d'ailleurs ce que nous venons de dire :

Acidité	+ 0,2 (réaction alcaline)
Acidité Sørensen	1 cm ³ 5, soit 0 gr. 510 en NH ³ par litre
NH ³ par litre.	0,510 gr.
NH ³ utilisé	0,978 —
Poids des cultures par litre.	0,870 —

La fonction alcool donne des résultats inférieurs, ainsi qu'il résulte de l'analyse des ballonsensemencés sur lactate de soude à 5 p. 100, sel que le subtilis utilise contrairement au pyocyanique :

Acidité	0 cm ³ 8
Acidité Sørensen	3,2, soit 1 gr. 088 en NH ³ par litre
NH ³ par litre.	1,12 gr.
NH ³ utilisé	0,348 —
Poids des cultures par litre.	0,450 —

Dans les conditions où nous sommes placé, la nature de l'aliment carboné exerce donc une influence nette sur la vitesse d'utilisation¹ de l'azote par les bacilles étudiés. La source carbonée donnant les meilleurs résultats était fournie par les carbones cétoniques, puis venait le carbone aldéhydique et enfin les carbones liés directement à l'hydrogène.

D'autre part, la comparaison de l'action du glucose et du lévulose semble une nouvelle preuve à l'appui de l'hypothèse formulée autrefois, et reprise par Lindet et plus récemment par Molliard et par Colin, suivant laquelle le lévulose serait surtout un aliment de construction.

¹. Il s'agit, nous y insistons, d'une simple question de vitesse d'utilisation de l'azote et non de rendement. Le rendement de l'azote mesuré par le poids de récolte supposerait en effet que toujours le poids des cultures est parallèle à son contenu en azote, que la richesse du bacille en azote est constante.

CHAPITRE VI

Relations entre les conditions de cultures et la formation de la pyocyanine

Le bacille pyocyanique a pour propriété essentielle et spécifique la production de pyocyanine, dit Gessard. C'est la raison qui nous a conduit à étudier d'une façon particulière les conditions de formation du pigment.

La pyocyanine a été mise en évidence pour la première fois par Fordos en 1860, des essais successifs pour déterminer sa composition chimique ont été faits par Lederhose (1888), Kuntz (1888), Madinaveita (1916). Selon Lederhose, qui isola le pigment à l'état de picrate, la formule serait $C^{14}H^{14}NO^2$, selon Kuntz, la molécule renfermerait en outre du soufre, selon Madinaveita le chlorhydrate aurait la composition : $C^{60}H^{59}N^{10}Cl^5O^3$. En dehors de l'hypothèse d'Armand Gautier suivant laquelle on pourrait penser à un dérivé anthracénique, on ne sait rien de plus au sujet de la constitution moléculaire de la pyocyanine. Nous n'avons pas abordé ce problème difficile, où la spectrophotométrie pourrait, sans doute, rendre de précieux services.

Grâce surtout aux travaux de Gessard entrepris en 1882 et poursuivis durant de nombreuses années, les conditions

de culture nécessaires à la production du pigment sont mieux connues : il faut qu'il y ait prédominance de l'élément azoté organique (1) et que les cultures soient faites à une température voisine de 37°. Un chauffage à 57° fait perdre au microbe sa fonction pyocyanogène (Gessard [2]). Cette suppression de la fonction peut être obtenue grâce à l'adjonction d'antiseptiques ou de sucres (Wasserzug), par la suppression de l'O (Wasserzug) ou la culture en oxygène pur (Charrin et Roger). Le vanadium ajouté à la dose de 1 à 5 °/° empêche également la production du pigment (Frouin et M^{lle} Ledebt).

Il semble enfin, depuis le travail de Frouin et M^{lle} Ledebt, que la magnésie soit un des éléments nécessaires au microbe pour former la pyocyanine, cet élément pouvant être remplacé, parfois avec avantage, par des sels de terres rares.

Nous nous proposons de reprendre l'étude de l'influence de l'élément azoté, de la réaction du milieu, des sucres, de la privation d'O

1° *Nature de l'aliment azoté et production de pyocyanine.* —

Tous les auteurs qui ont cultivé le bacille pyocyanique ont remarqué la facilité avec laquelle les cultures se chargent de pigment lorsqu'elles renferment de l'asparagine ou de la peptone. D'autre part Gessard (1), dans les cultures sur albumine et Charrin et Dissard, dans les cultures sur urée, ont signalé l'absence complète de pyocyanine. Bien plus, Wasserzug a montré que des substances comme le tartrate d' NH^3 , qu'il nomme substances empêchantes, s'opposent dans les milieux favorables au bleuissement des cultures.

Ces données porteraient à croire qu'un petit nombre

seulement d'aliments azotés assez complexes peuvent servir à l'élaboration du pigment bleu par le bacille pyocyanique. Il n'en est rien, l'asparagine et la peptone sont loin d'être les seules substances azotées capables de favoriser. chez le bacille pyocyanique, la fonction chromogène caractéristique et Jirou a déjà signalé la nécessité d'un sel organique ammoniacal ou d'une source d'azote organique adjointe à une source de carbone organique. ce qui permet au fond toutes les possibilités, sauf celle d'une source d'azote minéral. Avec Colin (1) nous avons repris la question en partant du milieu suivant :

Eau	1.000 gr. »
Phosphate de potasse.	2 »
Sulfate de magnésie	2 »
Chlorure de calcium	0 4
Acide citrique	5 »
Source azotée.	3 5

Plus tard nous avons supprimé le chlorure de calcium et remplacé l'acide citrique par la glycérine.

Nous sommes arrivés aux conclusions suivantes :
 1° l'azote introduit sous forme de sel ammoniacal de la plupart des acides gras permet la production de pyocyanine. Nous l'avons vérifié sur les acides acétique, propionique, butyrique, valérianique. Les premiers termes toutefois se prêtent moins bien que leurs homologues supérieurs à l'élaboration du pigment. L'acide formique ne donne aucune coloration. On obtient également de la pyocyanine avec les sels ammoniacaux des diacides tels que l'acide succinique (signalé déjà par Gessard) et des acides alcools : lactique, malique, tartrique, citrique.

2° On peut observer, *de façon inconstante* la formation de pyocyanine en employant, comme source azotée, des sels ammoniacaux des acides minéraux ; sulfate et chlorure d'ammonium :

3° Mais si l'on s'adresse aux nitrates les cultures ne présentent plus que le pigment vert fluorescent, très différent de la pyocyanine ;

4° L'asparagine paraît être l'aliment azoté le plus favorable à la production du pigment. L'aspartate de soude, l'aspartate d' NH_3 permettent également, du moins certaines formes stéréo-chimiques, l'obtention du pigment bleu :

5° Parmi les autres substances possédant le groupement amino-acide, l'acide glutamique, l'alanine, la tyrosine donnent de la pyocyanine ; nous n'avons obtenu que des résultats négatifs avec le glycocolle.

Il est juste de faire remarquer, avec les auteurs qui se sont occupés de la question que la coloration des cultures est sujette à certains caprices, généralement imputés à l'ensemencement.

RELATIONS ENTRE LA FORMATION DU PIGMENT ET LA STRUCTURE STÉRÉO-CHIMIQUE DE L'ALIMENT AZOTÉ¹. — Les corps que l'on emploie dans les milieux nutritifs comme source d'azoté peuvent exister à l'état de plusieurs stéréoisomères. Nous nous sommes demandé avec Frouin si la

¹. Nous devons signaler un travail récent de Goris et Liot, paru au cours de l'impression de cette thèse, dans lequel les auteurs ont constaté que dans les acides à fonction éthylénique, ce sont ceux en position trans qui donnent le pigment.

constitution stéréo-chimique était en relation avec la propriété pyocyanogène. Pour résoudre la question nous nous sommes adressés aux acides aspartiques. La technique est fort simple. On employait des tubes de gélose renfermant la solution nutritive minérale constituée par le sulfate de magnésie et le phosphate mono-potassique à la dose de 2 grammes par litre, plus l'aliment azoté à la dose de 5 grammes par litre. Cet aliment était soit l'aspartate de soude inactif, soit l'asparagine.

Les tubes à asparagine et à aspartate de soude gauche ont tous donné de la pyocyanine. Les tubes à aspartate de soude inactif sont restés incolores. L'acide aspartique droit que nous n'avons pu nous procurer doit donc être considéré comme empêchant. Un repiquage des cultures incolores sur tubes à asparagine a permis de réobtenir des cultures bleues. Notons que ni l'adjonction de sels de terres rares favorisants (thorium, cérium, lanthane), ni la substitution au sel de soude du sel d'ammoniaque n'ont permis d'obtenir avec l'acide inactif de cultures pigmentogènes.

L'explication du phénomène est assez malaisée. L'asparagine, nous l'avons démontré, est, avant d'être assimilée, transformée en acide aspartique, et l'on sait que l'asparagine naturelle se dédouble en acide aspartique inactif. L'hypothèse d'une assimilation de l'asparagine à l'état d'asparagine devant être rejetée, comment expliquer le fait que les cultures sur amide présentent le pigment et que celles sur acide inactif n'en présentent pas ? Peut-être faut-il admettre une accoutumance progressive du microbe. Quoi qu'il en soit il nous a semblé intéressant de signaler cette influence spécifique de la structure de

l'aliment sur la production de la pyocyanine, les cultures achromogènes restant au point de vue rendement comparables aux cultures chromogènes.

2° *Relations entre le pouvoir chromogène et la réaction du milieu.* — Cette question a déjà été abordée par Wasserszug qui montra que les acides suppriment la production de pyocyanine à une dose très voisine de la dose stérilisante, souvent même à cette dose. Nous nous sommes contenté de vérifier cela et ne donnerons pas le détail d'expériences analogues à celles que l'on trouve dans le travail de Wasserszug. La question de l'alcalinité n'avait pas été abordée. Voici une expérience type, faite avec du carbonate de soude (les autres alcalis agissent de façon analogue).

Des ballons renfermant 50 cc du milieu nutritif à l'asparagine sont rigoureusement neutralisés à la phtaléine. On ajoute alors $\frac{4}{10}$, $\frac{4}{10}$, $\frac{6}{10}$ etc., de cc. de solution de carbonate de soude au 1/10. Voici les résultats (le signe + indique une culture).

NUMÉROS DES BALLONS	1 ^{er} JOUR	2 ^e JOUR	3 ^e JOUR	4 ^e JOUR
1. neutre	+ coloré	+ coloré	+ coloré	+ coloré
2. 1/10 cc.	+ coloré	+ coloré	+ coloré	+ coloré
3. 4/10	+ coloré	+ coloré	+ coloré	+ coloré
4. 6/10	+ coloré	+ coloré	+ coloré	+ coloré
5. 8/10	+ coloré faible	+ coloré	+ coloré	+ coloré
6. 1 cm ³	+ incolore	+ coloré faible	+ coloré	+ coloré
7. 1 cc. 2/10	culture faible	+ incolore	+ incolore	+ coloré faible
8. 1 4/10	0	culture faible	culture faible	culture faible
9. 1 6/10	0	0	0	0
10. 1 8/10	0	0	0	0

Les alcalis, comme les acides, ne suppriment donc la fonction chromogène du microbe qu'à une dose très voisine de la dose stérilisante.

3° *Action des sucres sur la fonction pigmentaire.* — Parmi les substances qui s'opposent à l'élaboration de la pyocyanine par le bacille pyocyanique. Wasserzug cite les sucres : si l'on ajoute à du bouillon de veau des doses croissantes de glucose, la coloration bleue des milieux diminue d'intensité et, bientôt, disparaît. Une concentration relativement faible de glucose serait suffisante pour entraver complètement la production de pyocyanine. Wasserzug signalait ce phénomène curieux, dont l'explication lui échappait. Avec Colin (2) nous avons essayé de pénétrer plus avant dans le problème.

Le bacille pyocyanique se développant sur milieux organiques : bouillon de viande, peptone, asparagine, par conséquent dans les conditions reconnues les plus favorables à l'élaboration du pigment, s'y conduit, d'une façon absolument constante comme un *ferment ammoniacal*, élaborant de l'ammoniaque aux dépens de l'azote organique et alcalinisant le liquide de culture¹.

Si l'on introduit dans la culture, du glucose, ou d'une façon plus générale, des hydrates de carbone assimilables, ceux-ci modifient la physiologie du bacille dans ses deux traits essentiels, ils augmentent la consommation de l'ammoniaque (donc restreignent la quantité d'ammoniaque libre finale) et acidifient le milieu. L'acidification

¹. Nous renvoyons pour la question quantitative aux tableaux de dosage publiés dans cette thèse aux chapitres III et V.

est elle la cause directe de la non-élaboration du pigment ou au contraire constitue t elle une simple indication des modifications du métabolisme microbien, modifications se traduisant, entre autres, par la perturbation de la fonction chromogène, c'est ce que nous avons essayé d'établir.

Deux séries de ballons renfermant le milieu à asparagine sont additionnées, une série A, de glucose en proportion croissante, une série B d'acide acétique en proportion croissante. On examine au bout de deux jours d'étuve les ballons, au point de vue de la production du pigment bleu : on choisit, dans chaque série le ballon qui renferme la dose limite rendant le milieu achromogène et l'on titre l'acidité.

Voici les résultats :

Série A. — Glucose 8 % Acidité finale = 0,002 N
en normalité.

Série B. — Acide acétique 0,06 %. Acidité finale = 0,004 N
en normalité.

Il est donc possible d'avoir de la pyocyanine, dans des milieux présentant une acidité double de l'acidité produite par le glucose en quantité empêchante.

L'acidification du milieu par les sucres est donc au moins une explication insuffisante. C'est qu'en réalité, l'action des hydrates de carbone est complexe. Il y a d'abord une action osmotique. Le saccharose et la mannite à la concentration de 15 % empêchent la production du pigment, sans jouer un rôle dans l'alcalinité :

	Alcalinité en normalité
Ballon à saccharose 15 % . . .	0,007 N
Ballon à mannite 15 % . . .	0,007 N
Témoin	0,007 N

Il y a aussi, comme l'a vu Gessard (4) une question de proportion entre la quantité d'aliment azoté et d'aliment hydrocarboné : pour une même concentration de glucose (5 %) on peut avoir production de pyocyanine si le milieu renferme 5 % d'asparagine ou culture achromogène, si le milieu n'en renferme que 1 %. L'acidification des milieux ne peut donc être considérée que comme un témoin de la modification de la physiologie du bacille sous l'influence des sucres. Comment se produit cette modification, la question reste posée comme reste posée la question de non production de toxine par le bacille diphtérique dans les cultures renfermant des hydrates de carbone.

4° *Action de l'anaérobiose sur la production de pyocyanine.*
 — C'est Wasserzug qui le premier a montré que des cultures de bacilles pyocyaniques faites en atmosphère confinée ou en milieu privé d'oxygène restaient incolores. Comme Wassermann a émis l'hypothèse que la pyocyanine était engendrée dans les cultures à l'état de leucobase qui, en s'oxydant au contact de l'air, prendrait une coloration bleue, on pouvait espérer obtenir des cultures anaérobies un pro-pigment qui, oxydé, donnerait la pyocyanine. Nous avons donc repris à ce point de vue les expériences de Wasserzug, mais des cultures anaérobies incolores, traitées par un courant d'air prolongé, par les

oxydants doux ou énergiques, ne nous ont jamais montré de pigment. S'il y a une leucobase, elle ne se forme pas lorsque le microbe est privé d'air. Mais la question de la leucobase elle-même doit être réservée, si on songe que des substances inertes sont capables, en milieu aérobic d'arrêter la production de la pyocyanine.

5^e *Conclusion*. — En résumé, le pigment pour se former exige la présence d'un sel organique ammoniacal ou d'un mélange glycérine — sel ammoniacal minéral. La structure stéréo-chimique de l'aliment azoté peut n'être pas indifférente, comme nous l'avons constaté pour les acides aspartiques. Il faut ajouter en outre la nécessité démontrée par Frouin que nous n'avons pas cru devoir vérifier de la magnésie. Certains hydrates de carbone, introduits dans le milieu de culture entravent la production du pigment. Cet empêchement n'est pas dû au changement de réaction du milieu (les acides ou les bases permettent la formation de pyocyanine à des doses voisines des doses mortelles) mais à une modification de la physiologie du microbe. La nécessité de la présence d'oxygène pour obtenir des cultures chromogènes ne paraît pas suffisante pour affirmer l'existence d'une leucobase.

CHAPITRE VII

Le pouvoir stérilisant des acides

On admet, en général, une relation directe entre le pouvoir nocif des acides sur les bactéries et le degré de dissociation électrolytique, c'est-à-dire, finalement, la concentration des solutions en ions H. Si la nature des acides joue un rôle, les acides les plus dissociés sont les plus actifs. Ceci découle des travaux de Paul et Kroenigs, Michaelis et Marcora, Brünn, Wyeth, etc.

Cependant les résultats de Lingelsheim⁴, pour qui les solutions équimoléculaires d'acides ont même pouvoir antiseptique, ceux de Paul, Birstein et Reuss qui, comme Reichel, disent que l'effet désinfectant de l'acide acétique est plus grand que celui de l'acide chlorhydrique, pour des solutions iso-hydriques ; ceux de Kiesel, qui, sur *Aspergillus niger*, il est vrai, voit que les acides s'opposant le plus énergiquement au développement de

⁴. Il est vrai qu'en solutions très étendues, les acides expérimentés peuvent être considérés comme totalement dissociés.

la moisissure sont les acides gras, ceux de Ch. Richet fils et Gigon, qui constatent que l'acide citrique est plus actif que l'acide chlorhydrique sur les bacilles du groupe typhique ; les considérations de J. de Rufz de Lavison au sujet de la pénétration des acides dans le protoplasme des plantes ; enfin les tableaux dressés par Miquel ne plaident guère en faveur d'une action exclusive ou même prédominante des cathions.

Il est bon d'ajouter, ce qui augmente la confusion, que l'on s'est préoccupé tantôt du pouvoir stérilisant, tantôt du pouvoir bactéricide des acides, et que l'on s'est adressé à des espèces microbiennes diverses, souvent impures, cultivées en milieux de composition chimique inconnue ou mal déterminée.

C'est l'étude du pouvoir stérilisant de divers acides sur le bacille pyocyanique que nous avons eue en vue.

Le microbe a été cultivé sur le milieu :

	Pour 1.000
Asparagine	4 gr. »
Citrate de soude	2 5
Phosphate de potasse	1 »
Sulfate de magnésie	1 »
Eau : quantité suffisante.	

qui vire au rouge neutre. Le développement est facile, abondant, accompagné d'une production d'ammoniaque notable se traduisant par un virage final net à la phénol-phtaléine.

Au liquide, réparti par volumes de 10 cm³ dans des tubes à essai, nous ajoutions des quantités croissantes de

l'acide à étudier. Nous ensemencions ensuite avec 3 gouttes d'une culture de 24 heures, et les résultats étaient consignés 24 heures plus tard. Il est inutile de retarder la lecture, le sens des chiffres ne changeant pas avec le temps. En outre, à l'aide de la méthode des indicateurs colorés de Sörensen, nous avons déterminé la concentration en ions H des tubes limites, au départ.

Nos expériences sont résumées dans le tableau suivant :

		Dose stérilisante (en milimolécules pour 10 cm ³)	Concentration en ions H
1 ^{er} groupe	H.CO ₂ H	0,105	10-4,3
	CH ³ .CO ₂ H	0,106	10-4,7
2 ^e groupe	CO ₂ H - CO ₂ H	0,121	10-3,7
	CO ₂ H -- (CHOH - CO ₂ H	0,125	10-1,2
	CH ³ - CHOH - CO ₂ H	0,248	pas déterminée
3 ^e groupe	SO ⁴ H ²	0,135	10-3
4 ^e groupe	PO ⁴ H ³	0,116	10-4,7
	HCl	0,332	10-2,8
	NO ³ H	0,339	10-2,8

La nature des acides semble donc jouer un rôle important. Les acides des deux premiers groupes, acides organiques, produits de dégradation, dont la toxicité est d'autant plus grande que le poids moléculaire est plus faible, sont les plus actifs. Les acides minéraux (sauf l'acide sulfurique, qui occupe une place intermédiaire difficile à expliquer autrement que par une action spécifique) agissent simplement suivant leur normalité et sont les mieux supportés par le bacille. Par contre, les résultats

obtenus ne mettent pas en évidence une influence prépondérante du cathion : et, d'autre part, ainsi que l'a montré Reichel, il arrive souvent que les sels des acides plus dissociés que les acides libres (acétate de Na par exemple) ne sont pas toxiques. L'anion, par lui-même n'a donc pas non plus un pouvoir nocif spécifique.

Les sels, en solutions acides, ont le même pouvoir toxique que les acides libres, ceci a déjà été observé par Reichel sur les moisissures et nous l'avons confirmé sur le pyocyanique : la dose stérilisante limite de l'acide acétique pour un milieu déterminé est de 0,0106 N, si l'on ajoute au même milieu 2 gr. pour 1000 d'acétate de soude et des quantités croissantes d'acide sulfurique, on constate que tout développement est devenu impossible pour une acidité sulfurique 0,0104 N.

Crozier étudiant la pénétration des acides dans les cellules de *Chromodoris zebra*, pense pourtant que dans les cas qu'il a examinés, la dissociation joue un rôle, et, en fait, les courbes de pénétration des acides forts diffèrent notablement de celles des acides faibles. Ce n'est pas notre cas, et ce n'était pas le cas de Harvey, qui a vu une relation entre la toxicité et la perméabilité, les facteurs de la perméabilité semblant être la solubilité hydrique et l'activité capillaire, les cellules se comportant à l'égard des acides comme si elles étaient des gouttes de graisse ou de solvant de graisses. Crozier admet d'ailleurs que la solubilité des acides dans les lipoïdes ou les substances protéiques, et, dans le cas de l'acide phosphorique, la densité du contenu cellulaire et la proportion de substances tampons (Buffer substances) ont une action sur la vitesse de pénétration.

Dans le cas qui nous occupe, l'étude du coefficient de partage entre l'huile et l'eau n'a donné aucun résultat. Nous opérons avec des solutions acides $\frac{N}{10}$ mélangées parties égales à de l'huile d'olive. Le mélange après agitation prolongée étant laissé 12 heures au repos, on décantait et l'on dosait l'acidité de la couche aqueuse. Dans toutes les expériences, l'acidité était celle du départ.

La mesure de la tension superficielle des solutions acides $\frac{N}{10}$ des divers acides expérimentés au sujet du pouvoir stérilisant n'a donné aucun résultat, cette tension étant sensiblement celle de l'eau pure.

Les vitesses de transport des différents ions ne s'ordonnent pas non plus comme le pouvoir toxique, si bien que nous en arrivons à conclure que le pouvoir stérilisant des acides vis-à-vis du bacille pyocyanique est conditionné par un ensemble complexe de facteurs dont l'étude devra être reprise en tenant compte de tout ce qui peut intervenir dans la pénétration. C'est ainsi que la nature du microbe (des expériences sur différents microbes montrent des différences dans l'ordre de toxicité) doit être prise en considération, la membrane et la couche externe du protoplasma jouant certainement un rôle qui s'ajoute aux propriétés spécifiques des divers acides.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous résumerons ici les faits nouveaux ou les confirmations de faits que nous pensons avoir établis dans notre travail.

I. — IDENTIFICATION DU MICROBE

1° Pour mettre en évidence l'attaque des sucres par le microbe, il faut employer les divers points de technique suivants :

a) Stériliser à part la solution de sucre (à l'autoclave, s'il s'agit d'hexoses ou de bioses difficilement hydrolysables : à la bougie, s'il s'agit de saccharose) et le bouillon.

b) Ajouter l'indicateur à froid dans le mélange sucre + bouillon.

c) Ne pas se fier à la seule indication d'un virage de l'indicateur pour conclure à une attaque des hydrates de carbone, mais procéder à des titrations alcalimétriques dans deux séries de matras, une sans sucre, l'autre avec sucre.

C'est à l'inobservance de ces règles que sont dues les discordances entre nos résultats et ceux de quelques-uns de nos devanciers.

2° En présence de sucre, la production d'ammoniaque est nettement diminuée pour le bacille fluorescent de Flügge : pour le pyocyanique, la formation de produits ammoniacaux est d'abord exaltée (confirmation de Bøhnke : Kendall et Farmer) : puis, dans les cultures âgées, à la suite d'une consommation exagérée d'ammoniaque, diminuée. Ce phénomène constitue un critérium sûr pour différencier le bac, fluorescent de Flügge du pyocyanique non-chromogène et avirulent.

II. — ETABLISSEMENT D'UN MILIEU MINIMAL

1° Les divers éléments qui se sont montrés nécessaires pour obtenir une culture du bacille en milieu synthétique sont :

a) *L'azote.* — Il est absolument nécessaire, ce qui avait été nié, de mettre à la disposition du microbe une source d'azote autre que l'azote atmosphérique. Sont capables parmi les aliments azotés de constitution chimique simple de donner des cultures : les acides aminés (asparagine, acides aspartiques, glutamique, alanine, cystine et tyrosine) l'urée, les sels ammoniacaux des acides organiques ou minéraux : succinique, formique, acétique, butyrique, tartrique, malique, lactique, oxalique, chlorhydrique, sulfurique et azotique.

b) *Le carbone.* — Ce corps est absolument nécessaire sous forme de carbone organique. Certains acides aminés, comme l'asparagine et les acides aspartiques, l'alanine, l'acide glutamique peuvent

servir de source de carbone ; d'autres, comme le glycocolle ou la leucine ne le peuvent pas. Ont été utilisés également avec succès les hexoses : glucose et lévulose, la glycérine, les acides organiques. Pour certains de ces derniers, l'utilisation n'est possible qu'à l'état de sel ammoniacal (acides formique, acétique, lactique, butyrique, tartrique, oxalique).

c) *Le soufre*. — Ce corps, peut être donné, soit à l'état de sulfate, soit à l'état organique (albumine). Son remplacement, par le sélénium, est impossible.

d) *Le phosphore*. — Cet élément est indispensable (confirmation de Benecke, Frouin et M^{lle} Ledebt). On peut le donner sous la forme organique de nucléinate de Na de la levure. On ne peut pas le remplacer par les arséniates.

e) *Magnésium*. — Ce corps, dont la nécessité a été très discutée, est indispensable (confirmation de Benecke). On ne peut le remplacer ni par le Ca, ni par le Sr, ni par le Va.

f) *Potassium*. — Il faut au microbe soit du potassium (confirmation de Benecke, Gessard, Frouin et M^{lle} Ledebt), soit du Rb ou du Cs (confirmation de Benecke).

2° Il ressort des résultats ci-dessus :

a) Qu'il existe deux sortes d'aliments plastiques : les aliments plastiques remplaçables et les aliments plastiques irremplaçables.

b) Qu'une distinction doit être établie entre les aliments plastiques remplaçables et les aliments catalytiques de G. Bertrand, qui augmentent le poids de la récolte mais dont la suppression n'entraîne pas la stérilité du milieu.

c) Que la culture en milieu simple met en évidence les propriétés synthétisantes remarquables du microbe.

III. — ATTAQUE DE L'ASPARAGINE

1° Les produits isolés au cours de cette attaque sont :

a) Acides fixes : acides malique et fumarique.

b) Acides volatils : acides propionique et formique.

c) Produits volatils autres : ammoniacque.

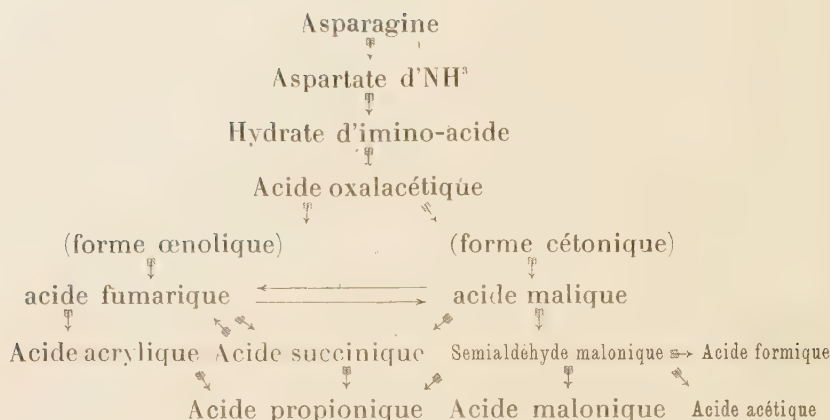
2° Le mécanisme de la dégradation se fait en deux temps :

a) Désamidation (confirmation d'Arnaud et Charin).

b) Désamination (phase analogue à celle observée par Blanchetière avec le fluorescent).

Le microbe ramène donc, pour l'utiliser, l'azote de l'acide aminé à l'état de sel ammoniacal.

3° De la discussion des résultats précédents, d'une part ; des résultats obtenus par les auteurs sur d'autres organismes, d'autre part, il est possible de se représenter la marche de la dégradation de l'asparagine par le tableau suivant :



IV. — L'ATTAQUE DE LA SOURCE DE CARBONE

1° Lors de l'attaque du glucose, ont été isolés : les acides acétique et formique et l'alcool éthylique.

2° Lors de l'attaque du lévulose, ont été isolés : les acides acétique, formique et lactique et l'alcool éthylique.

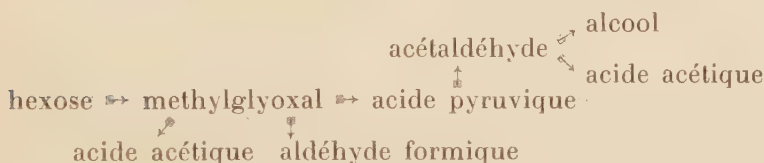
3° Lors de l'attaque de la glycérine, ont été isolés : les acides butyrique, acétique (confirmation de Fitz) et formique, et l'alcool éthylique (confirmation de Fitz).

4° Lors de l'attaque de l'acide succinique, ont été isolés : les acides propionique et formique et l'alcool éthylique.

5° Lors de l'attaque de l'acide citrique, ont été isolés : les acides acétique et formique et peut-être l'acide lactique.

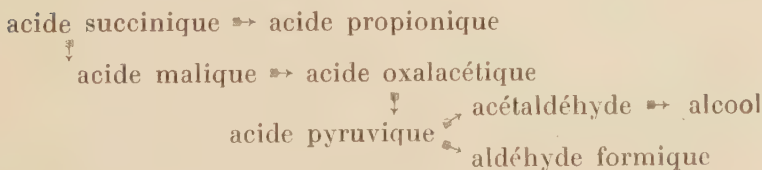
6° En ce qui concerne les hexoses, de l'étude des résultats des auteurs concernant l'action des réactifs sur le glucose et le lévulose, de la discussion de l'hypothèse de Loeb, il ressort que, vraisemblablement, les hexoses se dédoublent en termes en C^3 suivant le schéma de Wohl.

L'acide lactique (dont la formation aux dépens de l'acide pyruvique a été prouvé) n'étant pas utilisé par le microbe, l'alcool et l'acide acétique dérivent vraisemblablement du méthylglyoxal et de l'acide pyruvique (utilisés par le microbe) par l'intermédiaire de l'acétaldéhyde mise en évidence dans les cultures où sa seule source ne pouvait être qu'un hydrate de carbone. Quant à l'origine de l'acide formique, elle doit être cherchée dans le dédoublement du méthylglyoxal en acide acétique et aldéhyde formique (analogie avec ce que Fernbach a proposé pour le tyrothrix). L'ensemble de nos conclusions peut se résumer ainsi :



7° La présence de l'acide butyrique dans les cultures sur glycérine s'explique suivant l'hypothèse de Nencki, par une condensation de deux molécules d'aldéhyde en aldol.

8° La dégradation de l'acide succinique peut être représentée ainsi :



9° Les données acquises concernant l'acide citrique sont trop vagues pour qu'on puisse tenter un schéma de la dégradation.

V. — ATTAQUE DE LA SOURCE D'AZOTE EN PRÉSENCE
DE L'ALIMENT CARBONÉ

1° L'attaque d'un acide aminé non-utilisable, lorsqu'il est seul, est possible lorsqu'on lui adjoint une source de carbone organique assimilable.

2° La nature de l'aliment hydrocarboné a une influence nette sur la vitesse d'utilisation de l'azote de l'asparagine.

VI. — RELATIONS ENTRE LES CONDITIONS DE CULTURE
ET LA FORMATION DE PYOCYANINE

1° Le microbe est capable, aux dépens des sources d'azote les plus variées, de faire du pigment. La mise en évidence d'une influence nette d'un groupement azoté quelconque étant impossible.

2° Cependant, en ce qui concerne les acides aspartiques, la constitution stéréo-chimique n'est pas sans influencer la production du pigment, les cultures sur acide gauche donnant du pigment à l'encontre de celles sur acide inactif.

3° Les acides (confirmation de Wasserzug) et les alcalis ne s'opposent à la production de pyocyanine qu'à une dose voisine de la dose antiseptique.

4° L'acidification du milieu dans les cultures sur sucres ne peut donc être considérée comme la cause de la

non-production du pigment, mais comme un simple témoin de la modification de la physiologie du bacille. L'action des sucres est d'ailleurs complexe, la pression osmotique déterminée par leur adjonction, la proportionnalité entre la quantité d'aliment azoté et d'hydrate de carbone (confirmation de Gessard), jouent un rôle dans l'action empêchante des sucres.

5° Les cultures anaérobies ou en atmosphère confinée sont achromogènes (confirmation de Wasserzug). L'oxydation des bouillons incolores n'ayant jamais permis la mise en évidence de pyocyanine, on est conduit à rejeter l'hypothèse de la leucobase mise en avant par Wassermann.

VII. — ETUDE DU POUVOIR STERILISANT DES ACIDES

La nature des acides joue un rôle important dans cette question où l'influence prépondérante des ions H n'a pu être mise en évidence. L'ensemble complexe des facteurs qui régulent la pénétration des acides à l'intérieur de la cellule reste encore à déterminer.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

Identification du microbe

- E. AUBEL ET COLIN..... C. R. Soc. biol., T. LXXV, p. 23,
1913.
- BOEHNKE Arch. für Hyg., T. LXXIV, p. 81,
1911.
- BLANCHETIÈRE..... Ann. Inst. Past., T. XXXI, p. 291,
1917.
- GESSARD..... 1) Ann. Ins. Past., T. IV, p. 88, 1890.
2) — T. V, p. 65, 1891.
- GRIMBERT..... Bull. Inst. Past, T. II, p. 937, 1904.
- HELLER ET LEPÈRE Kolle Wassermann, 2^e édition,
Article pyocyannique, T. V, p. 1185.
- KENDALL ET FARMER..... Journ. of biol., Chem., T. XII, p. 20,
1912.
- KRAUSE..... Centr. für Bakt., T. XXVII, p. 769,
1900.
- LEHMANN ET NEUMANN..... Atlas u. Grundriss der Bakt., p. 213.
- MAILLARD Thèse fac. Sc. Paris, 1913.
- RUZICKA Centr. für Bakt., T. XXIV, p. 11,
1898
- SCHIMMELBUSCH ET MÜSCHAM... Arch. für klin. Chir., T. XLVI, n° 4,
1893.
- VOURLLOUD Centr. für Bakt., T. XLV, p. 198,
1908.

- WASSERZUG Ann. Inst. Past., T. 4, p. 586, 1887.
 WEISSEMBERG Arch. für Hyg., T. XXX, p. 274, 1897.

Etablissement d'un milieu minimal

- ARNAUD ET CHARRIN C. R. Ac. Sc., T. CXII, p. 795, 1891,
 BENECKE Bot. Zeit., T. I, p. 65, 1907.
 BERTRAND (Gabriel) Congrès international de Chimie,
 Berlin, 1903.
 BERTRAND ET JAVILLIER Bull. Soc. ch. de France, T. XI,
 p. 212, 1912.
 Bull. Soc. ch. de France, T. XI,
 p. 347, 1912.
 BLANCHETIÈRE Bull. Soc. Ch. biol., T. II, p. 29,
 1920.
 DELILLE (Armand), A. MAYER, G. SCHAEFFER ET E.-F. TERROINE.
 Jour. de phys. et path. gén.,
 T. 25, p. 797, 1913.
 EMBDEM ET SCHMITZ Bioch. Zeit., T. XXIX, p. 423, 1910.
 — T. XXXVIII, p. 347,
 1911.
 FROUIN C. R. Soc. biol., T. LXVIII, p. 915,
 1910.
 FROUIN ET M^{lle} LEDEBT C. R. Soc. biol., T. LXXII, p. 981,
 1912.
 GALIMARD ET LACOMME Journ. de phys. et path. gén., T. IX,
 p. 481, 1907.
 GESSARD Ann. Inst. Past. T. 5, p. 801, 1892.
 JAVILLIER 1) Thèse fac. Sc., Paris, 1908.
 2) C. R. Ac. Sc., T. CLVI, p. 406, 1913.
 3) Bull. Soc. ch. de France, T. XIII,
 p. 705, 1913.

JORDAN	Bot. Gaz., T. XXVII, p. 621, 1899.
KONWALEWSKI	Arch. russes de path., T. VI, p. 251, 1898.
KNOOP	Zeit. phys. Chem., T. LXVII, p. 489, 1910.
LEPIERRE	C. R. Ac. Sc., T. CLVI, p. 258 et 409, 1913. Bull. Soc. Ch. de France, T. XIII, p. 285-359-491-631 et 1107, 1913.
LÖW	Bot. Zentr., T. LXXIV, p. 202, 1898. Pflüger Arch., T. C, p. 335, 1903.
MACÉ	Traité de bactériologie, T. II, p. 333.
MAYER (André) et G. SCHAEFFER.	C. R. Soc. biol., T. LXXXII, p. 113, 1919.
NOSKE	Arch. für klin. Chir., T. LX, p. 386, 1900.
PROSKAUER ET BECK	Zeit. für Hyg., T. XVII, p. 147, 1894. — T. XVIII, p. 128, 1895.
RAULIN	Thèse fac. Sc. Paris.
SAUTON	C. R. Ac. Sc., T. CLV, p. 1551, 1912. C. R. Ac. Sc. T. CLV, p. 860, 1912.
SULLIVAN	Bakt. Zentralbl., T. X, p. 386, 1903.
THUMM	Arb. a. d. bakt. Lab. d. tech. Hoch- schule Karlsruhe, T. I, p. 291, 1895.
ZWARDEMAKER	Arch. Néer. de phys. de l'homme et des animaux, T. IV, p. 177, 1920.

Attaque de l'Asparagine

ABDERHALDEN ET FODOR	Zeit. phys. Chem., T. LXXXV, p. 112, 1913.
AGULHON	Bull. Soc. ch. de France, T. XIII, p. 404, 1913.

- ARNAUD ET CHARRIN. C. R. Ac. Sc., T. CXII, p. 755, 1891.
- BLANCHETIÈRE Ann. inst. Past. T. XXXIV, p. 392, 1920.
- BLUM ET WORINGER Bull. Soc. Ch. Biol., T. II, p. 88, 1920.
- BORCHARDT Zeit. phys. Chem., T. LIX, p. 96, 1909.
- BOUGAULT. Jour. ph. et Ch., T. VIII, p. 280, 1913.
- BRASCH Bioch. Zeit., T. XXII, p. 403, 1909.
- DAKIN 1) Journ. of biol. Chem., T. V, p. 303, 1908-1909
2) Journ. of biol. Chem. T. V. p. 409, 1908-1909.
- DENIGÈS Précis de Chimie analytique.
- DUGLAUX Ann. Inst. Past. T. IX, p. 265, 1895.
- DYER Journ. of biol. Chem. T. XXVIII, p. 445, 1916-1917.
- EFFRONT C. R. Ac. Sc., T. CLXI, p. 739, 1908.
- EHRLICH (F.) Bioch. Zeit., T. XVIII, p. 391, 1909.
- ELLINGER Erg. d. Phys., T. VI, p. 48, 1907.
- EMMERLING ET REISER Ber., T. XXXV, p. 700, 1902.
- FROUIN ET M^{lle} LEDEBT C. R. Soc. biol., T. LXX, p. 24, 1914.
- V. FÜRTH ET FRIEDMANN Bioch. Zeit., T. XXVI, p. 435, 1910.
- HARDEN Jour. chem. Soc., T. LXXIX, p. 612, 1901.
La fermentation alcoolique.
- HOPKINS ET FLETCHER Journ. of phys., T. XXXV, p. 247, 1907.
- KNOOP ET KERTESS Zeit. phys. Ch., T. LXXI, p. 252, 1911.
- LANG Beitr. zur chem. Phys. und Path. T. V, p. 34, 1904.

MESTREZAT	C. R. Ac. Sc., T. CXLIII, p. 185, 1906.
MIQUEL	Bull. Soc. Ch. de France, T. XXXI, p. 101, 1879.
NEUBAUER	Deutsch. Arch. f. klin. Med., T. VL, p. 211, 1909.
NEUBAUER ET FROMHERZ	Zeit. phys. Chem., T. LXX, p. 326, 1911.
NEUBERG ET CAPPEZUOLI	Bioch. Zeit., T. XXVIII, p. 424, 1909.
NEUBERG ET ROSENBERG	— T. VII, p. 178, 1907.
NEUBERG ET JAMAKAWA	— T. LVII, p. 90, 1914.
PINERUA	C. R. Ac. Sc., T. CXXIV, p. 291, 1897.
PIRIA	Ann. ch. Ph. (3), T. XXII, p. 160.
PRINGSHEIM	Bioch. Zeit., T. XII, p. 15, 1908.
RINGER	Journ. of biol. chem., T. XIV, p. 539, 1913.
SALKOWSKI E. ET H.	Ber., T. XII, p. 648, 1879.
SCHUTZENBERGER	Dictionnaire de Wurtz, Article fer- mentation.

Attaque de la Source de Carbone

AUBEL	C. R. Soc. biol., T. LXXXIV, p. 574, 1921.
BEIJERINCK ET FOLPMERS	Kon. Akad. Weten-Amsterdam, T. VII, p. 119, 1916.
BERTHELOT ET ANDRÉ	Ann. de Ch. et Ph., T. XI, p. 171.
BERTHELOT ET GAUDECHON	C. R. Ac-Sc., 1 ^{er} août 1910.
BERTRAND (Gabriel)	Thèse fac. Sc. Paris, 1904.
J. BIELECKI ET R. WURMSER . . .	C. R. Ac. Sc., T. CLIV, p. 1429, 1912.
BIERRY, V. HENRI ET RANC	C. R. Ac. Sc., 25 juillet 1910.
H. BIERRY ET P. PORTIER	C. R. Ac. Sc. T. CLXVI, p. 1055, 1918.

- BLUM..... Münchn. med. Wochenschr, p. 683,
1910.
- BOSWORTH ET PRUCHA..... Journ. of biol. Chem., T. VIII,
p. 479, 1910.
- BUCHNER, LANGHELD ET SKRAUP. Ber., T. XLVII, p. 2550, 1914.
- BUCHNER ET MEISENHEIMER.... Ber., T. XXXVII, p. 417, 1904.
— T. XXXVIII, p. 620, 1905. ,
— T. XXXIX, p. 3201, 1906.
- BUCHNER, MEISENHEIMER ET SCHADE. Ber, T. XXXIX, p. 4217, 1906.
- CLARA COHEN Bioch. Zeit., T. CXII, p. 137, 1920.
- CONNSTEIN ET LUEDECKE Ber., T. LII, p. 1385, 1919.
- CONRAD ET GUTHZEIT Ber., T. XIX, p. 2569, 1886.
- DAKIN 1) Journ. of biol. chem., T. XIV,
p. 555, 1913.
2) Münchn. med. Wochenschr.,
p. 1451, 1910.
- DAKIN ET DUDLEY. 1) Journ. of biol. Chem., T. XV,
p. 127, 1913.
2) Journ. of biol. Chem., XIV,
p. 155, 1913.
- DUCLAUX..... C. R. Ac. Sc., T. CIII, p. 881, 1886.
- EMBDEN ET KRAUS..... Bioch. Zeit., T. XLV, p. 1 et 206, 1912.
- EMBDEN ET OPPENHEIMER Bioch. Zeit., T. XLV, p. 188, 1912.
- EMBDEN, BALDES ET SCHMITZ... Bioch. Zeit., T. LXV, p. 108, 1912.
- EOFF, LINDER ET BEYER Journ. Ind. and Engin. Chem.,
T. XI, p. 842, 1919.
- ERLENMEYER..... Bull. Soc. ch. de France, T. X,
p. 259, 1868.
- FERNBACH C. R. Ac. Sc., T. CLI, p. 1004, 1910.
- FERNBACH ET SCHOEN 1) C. R. Ac. Sc., T. CLVII, p. 1468,
1913.

- FERNBACH ET SCHOEN..... 2) C. R. Ac. Sc., T. CLVIII, p. 1719, 1914.
 3) C. R. Ac. Sc., T. CLXX, p. 764, 1920.
 4) Bull. Inst. Past., T. XVII, p. 385, 1920,
- FITZ..... 1) Bull. Soc. Ch. de France, T. XXXIII, p. 188, 1880.
 2) Bull. Soc. Ch. de France, T. XLIII, p. 1393, 1885.
- GAYON ET DUBOURG..... Ann. Inst. Past., T. VIII, p. 108, 1894.
 — T. XV, p. 527, 1901.
- GREY..... Bioch. Jour., T. VII, p. 359, 1913.
- GRIMBERT..... 1) Ann. Inst. Past., T. VII, p. 353, 1893.
 2) Ann. Inst. Past., T. IX, p. 840, 1895.
- GRIMBERT ET LEGROS..... 3) Ann. Inst. Past., T. XIV, p. 479, 1900.
- HARDEN..... Journ. Chem. Soc., T. XXIX, p. 610, 1901.
- HLAŠIVETZ ET HABERMANN..... Ber., T. III, p. 486, 1870.
- HERZFELD..... Liebigs Ann. T. CCXLIV, p. 274, 1888.
- HÖNIG..... Ber., T. XIX, p. 179, 1886.
- HOPPE-ZEYLER..... Ber., T. IV, p. 346, 1871.
- JENSEN..... Ber. deutsch. bot. Ges. T. XXVI a, p. 666, 1908.
- KARCZAG ET NEUBERG..... Bioch. Zeit., T. XXXVI, p. 60 68-76, 1911.
- KAYSER..... Ann. Inst. Past., T. IX, p. 737, 1895.
- KILIANI..... Liebigs Ann., T. CCV, p. 145, 1880.

- KOSTITCHIEW Zeit. phys. Chem., T. LXXIX,
p. 131, 1912.
- KOSTITCHIEW ET HUBBENET Zeit. phys. Chem., T. LXXIX,
p. 359, 1912.
- LAFAR In Neuberg et Nord Bioch. Zeit.,
T. LXXXXVI, p. 135, 1919.
- LEATHES Problems in animal metabolism.
London, 1906, p. 81.
- LEBEDEFF ET GRIAZNOFF Ber., T. XLV, p. 3256, 1912.
- LEMOIGNE Thèse fac. Sc., 1915
- LEVENE ET MEYER Journ. of biol. Chem., T. XIV,
p. 149 et 351, 1913.
- LINTNER ET LIEBIG Zeit. phys. Chem., T. LXXII, p. 449,
1911.
- LOBRY DE BRUYN Rec. trav. chim., T. XIV, p. 203,
1895.
- LOEB 1) Landw. Jahr., T. XXXV, p. 541,
1907; Bioch. Zeit., T. XLII, p. 540,
1907; Zeit. Electr., T. XII, p. 282,
1906, T. XIII, p. 511, 1907; Bioch.
Zeit., T. XXIX, p. 311, 1910.
2) Bioch. Zeit., T. XVII, p. 132, 1909.
3) Bioch. Zeit., T. L, p. 451, 1913.
- MACAGUS Gaz. Chem. Ital., T. XI, p. 443.
- MAGNUS-LEVY Arch. Anat. Phys., p. 365, 1902.
- MARTINAUD C. R. Ac. Sc., T. CXLIX, p. 465,
1909.
- MAYER P. Bioch. Zeit., T. II, p. 435, 1907.
- MAZÉ 1) Ann. Inst. Past., T. XVI, p. 433,
1902.
2) C. R. Ac. Sc., T. CLVI, p. 1101,
1912.

- MAZÉ..... 3) C. R. Soc. biol., T. LXXXI, p. 1150, 1918.
4) C. R. Ac. Sc. T. CXXXIV, p. 240, 1920.
- MAZÉ ET RUOT..... C. R. Soc. biol., T. LXXIX, p. 706, 1916. — T. LXXX, p. 336, 1917.
- MEISENHEIMER..... Ber., T. XLI, p. 1009, 1908.
- MORREL ET CROFTS..... Journ. Chem. Soc., T. LXXXI, 1902.
- MUELLER THURGAU ET OSTERWALDER. Lander. Jahr. d. Schweiz, T. XXIX, p. 40, 1915.
- NEF..... Liebig's Ann. T. CCCXXXV, p. 247, 1904.
Liebig's Ann., T. CCCLVII, p. 2111, 1907.
- NENCKI.. .. in Armstrong the simple carbohydrates and glucosids.
- NEUBAUER..... Deut. Arch. f. klin. Med., T. VC, p. 211, 1909.
- NEUBERG..... Bioch. Zeit., T. LXXI, p. 1, 1915.
- NEUBERG ET BRASCH..... Bioch. Zeit., T. XVIII, p. 299, 1903.
- NEUBERG ET FAERBER..... Bioch. Zeit., T. LXXVIII, p. 238, 1917.
- NEUBERG ET HIRSCH..... Bioch. Zeit., T. XCVI, p. 175, 1919.
- NEUBERG ET KERB..... Bioch. Zeit., T. LVIII, p. 158, 1914.
- NEUBERG ET NORD..... Bioch. Zeit., T. XCVI, p. 133 et 158, 1919.
- NEUBERG NORD ET WOLFF..... Bioch. Zeit., T. CXII, p. 144, 1920.
- NEUBERG ET RHEINFURTH..... 1) Ber., T. LII, p. 1677, 1919.
2) Bioch. Zeit., T. LXXXIX, p. 365, 1918.
3) Bioch. Zeit., T. XCII, p. 234, 1918.
- NEUBERG ET STEENBOCK..... Bioch. Zeit., T. LII, p. 494, 1913.
- NEUBERG ET WELDE..... Bioch. Zeit., T. LXVII, p. 104, 1914.

- PASTEUR C. R. Ac. Sc., T. XLV, p. 913, 1857.
T. XLVII, p. 224, 1858.
T. LII, p. 344, 1861.
- PINKUS Ber., T. XXXI, p. 31, 1898.
- PERDRIX 1) Ann. Inst. Past., T. V, p. 286.
1891.
2) Bull. Soc. Ch. de France,
T. XXIII, p. 645, 1900.
- PÉRÉ 1) Ann. Inst. Past., T. VI, p. 512.
1892.
2) Ann. Inst. Past., T. X, p. 417,
1896.
- PERSONNE In Dictionnaire de Wurtz. Article
fermentation.
- PETERSON ET E. B. FRED Journ. of biol. Chem., T. XLII,
p. 273, 1920.
- RANC Thèse fac. Sc. Paris, 1914.
- ROESER Ann. Inst. Past., T. VII, p. 41, 1893,
- SAUTON ET TRILLAT C. R. Ac. Sc., T. CXLVI, p. 996, 1908.
- SCHADE Zeit. phys. Ch., T. LX, p. 510, 1907,
Bioch. Zeit., T. VII, p. 299, 1908.
- SCHUTZENBERGER Article fermentation. Dictionnaire
de Wurtz.
- SCHUTZENBERGER ET DESTREM .. C. R. Ac. Sc., T. LXXXVIII, p. 593,
1879.
- VOISENET Ann. Inst. Past., T. XXVII, p. 807,
1913.
- WIRGIN Zeit. für Hyg, T. XL, p. 307, 1902.
- WOHL Ber., T. XXXIV, p. 1139, 1904.
- WOHL ET NEUBERG Ber., T. XXXIV. p. 3095, 1904.

Attaque de la source d'azote en présence de l'aliment carboné

AUBEL.....	C. R. Soc. Biol., T. LXXXIV, p. 574, 1921.
BLANCHETIÈRE	Bull. Soc. Ch. biol., T. II, p. 29, 1920.
II. COLIN.....	C. R. Ac. Sc., T. CLXVIII, p. 697, 1919.
LINET	Ann. Agr., T. XXVI, p. 103, 1910.
MOLLIARD.....	C. R. Ac. Sc. T. CLXVII, p. 1043, 1919.

**Relations entre les conditions de culture
et la formation de pyocyanine**

AUBEL ET COLIN	1) C. R. Soc. biol., T. LXXIV, p. 790, 1913. 2) C. R. Soc. biol., T. LXXV, p. 25, 1913.
CHARRIN ET DISSARD.....	Mém. Soc. biol., T. XLV, p. 183, 1893.
CHARRIN ET ROGER.....	C. R. Soc. biol., 29 octobre 1887.
FORDOS.....	C. R. Ac. Sc., T. LI, p. 215 et 362, 1860.
FROUIN ET M ^{lle} LEDEBT.....	C. R. Soc. biol., T. LXXII, p. 981, 1912.
GAUTHIER (Armand)	Les toxines, Paris, p. 171.
GESSARD	1) Ann. Inst. Past., T. IV, p. 88, 1890. Ann. Inst. Past., T. XVI, p. 313, 1902. 2) Ann. Inst. Past., T. V, p. 65, 1891.
JIROU	Journ. phys. et path. gén., T. III, p. 188, 1901.
KUNTZ.....	Monat. für Ch., T. IX, p. 361.
LEDERHOSE.....	Deutsche Zeit. für Chemie, T. XXVIII, 1888.

- MADINAVEITA..... Ann. Soc. Esp. de Ch. phys.,
T. XIV, p. 263, 1916.
WASSERMANN Kolle-Wassermann, 1^{re} édition. Ar-
ticle pyocyannique, T. III, p. 471.
WASSERZUG Ann. Inst. Past., T. I, p. 586, 1887.

Etude du pouvoir stérilisant des acides

- BRÜNN..... Dissert., Berlin, 1913.
CROZIER Journ. of biol. ch., T. XXIV, p. 253.
1916 et T. XXXV, p. 455, 1918.
DE RUFZ DE LAVISON Ann. Sc. Nat. (Bot.), T. XIV, p. 97,
1911.
HARVEY..... Zeit. phys. chem. biol., T. I, p. 463,
1914.
KIESEL..... C. R. Ac. Sc., T. CLV, p. 193, 1912.
KITASATO Zeit. für Hyg., T. III, p. 404, 1880.
LINGELSHEIM..... Zeit. für Hyg., T. VIII, p. 203, 1885.
MICHAELIS ET MARCORA..... Zeit. für Imm., T. XIV, p. 170, 1912.
MIQUEL Annuaire de Montsouris, 1884.
PAUL, BIRSTEIN ET REUSS Bioch. Zeitschr., T. XXIX, p. 249,
1910.
PAUL ET KROENIGS..... Zeit. für Hyg., T. XXV, p. I, 1897.
REICHEL..... Bioch. Zeit., T. XXX, p. 152, 1911.
CH. RICHET FILS ET GIGON C. R. Soc. biol., T. LXXXII, p. 322,
1919.
WYETH Bioch. Journ., T. XII, p. 382, 1918.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	5

CHAPITRE PREMIER. — *Origine et caractérisation du microbe*

1° Origine et caractères morphologiques. — Production de pigments. — Action sur les substances azotées et les hydrates de carbone	9
2° Etablissement d'un critère de différenciation entre le bac. fluorescent de Flügge et le pyocyanique achromogène et avirulent.....	11

CHAPITRE II. — *Etablissement d'un milieu minimal*

3° Source d'azote.....	14
4° Source de carbone.....	18
5° Source de soufre.....	19
6° Source de phosphore.....	20
7° Source de magnésie.....	21
8° Source de potassium.....	22
9° Discussion des résultats et conclusions.....	23

CHAPITRE III. — *Attaque de l'asparagine*

10° Produits de dégradation	28
a) Technique.....	29
b) Résultats.....	32

	Pages
11° Mécanisme de la dégradation.....	36
a) Désamidation et désamination	39
b) Origine des produits isolés.....	39

CHAPITRE IV. — *Attaque de la source de carbone*

12° Technique.....	48
13° Résultats	48
a) Sur glucose.....	48
b) Sur lévulose	50
c) Sur glycérine.....	51
d) Sur succinate de soude	52
e) Sur citrate de soude.....	53
14° Mécanisme de dégradation des hexoses.....	53
a) Dédoublément	54
b) Origine de l'acide lactique	59
c) Origine de l'alcool et de l'acide acétique	61
d) Origine de l'acide formique.....	67
15° Dégradation de la glycérine	69
16° Dégradation de l'acide succinique	70
17° Dégradation de l'acide citrique.....	71

CHAPITRE V. — *Attaque de la source d'azote en présence de l'aliment carboné*

18° Attaque d'un acide aminé inattaquable lorsqu'il est seul.	72
19° Influence de la nature de l'aliment carboné sur la vitesse d'utilisation de l'azote.....	73

CHAPITRE VI. — *Relations entre les conditions de culture et la formation de la pyocyanine*

20° Nature de l'aliment azoté et production de pyocyanine...	78
a) Relation entre la formation du pigment et la structure stéréo-chimique de l'aliment azoté	80

	Pages
21° Relations entre le pouvoir chromogène et la réaction du milieu	82
22° Action des sucres sur la fonction pigmentaire	83
23° Action de l'anaerobiose sur la production de pyocyanine..	85
24° Conclusions	86

CHAPITRE VII. — *Le pouvoir stérilisant des acides*

25° Influence de la nature de l'acide.....	87
26° Exposé de quelques résultats concernant l'étude de facteurs qui pourraient régler la pénétration des acides à l'intérieur de la cellule	88
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	92
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	100

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Physiologie. — Le métabolisme des triglycérides.

Géologie. — Les Hommes fossiles.

Vu et approuvé :

Paris, le 26 Octobre 1921.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. MOLLIARD.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

P. APPELL.

Caen. — Imprimerie E. LANIER, 31, Boulevard Bertrand
